# Funktionelle und biochemische Untersuchungen zur Anoxietoleranz des Herzmuskels und ihrer pharmakologischen Beeinflußbarkeit

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heiner Ingo Seifart
aus Windhoek / Südwest Afrika

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0032

# Funktionelle und biochemische Untersuchungen zur Anoxietoleranz des Herzmuskels und ihrer pharmakologischen Beeinflußbarkeit

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heiner Ingo Seifart
aus Windhoek / Südwest Afrika

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 1978
Dekan: Prof. Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Siess
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. M.Siess, Direktor des Pharmakologischen Instituts der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. M.Siess für die Überlassung des Themas und besonders für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Für die Einweisung und Mithilfe bei den biochemischen Analysen danke ich Frau Dr. rer. nat. S.Poplawski; Herrn U. von Hees danke ich für die Einweisung in die Atom-Absorptions-Spektrophotometrie.
Für Ratschläge und Hilfe bei methodischen Problemen sowie die Hilfe bei der Ausgestaltung der Arbeit danke ich Herrn Dr. med. H.J.Mensing, Herrn K.Stieler und Frau A.Weible.

Herrn Prof. Dr. med. D.Winne möchte ich für die freundlichen Ratschläge und die Unterstützung bei der statistischen Planung und Auswertung der Versuchsergebnisse danken.
Ferner gilt mein Dank der ganzen Arbeitsgruppe, die durch gute Zusammenarbeit und große Diskussionsfreudigkeit optimale Arbeitsbedingungen ermöglichte.

Die Arbeit wurde mit der Unterstützung der
Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Über Teile der vorliegenden Ergebnisse wurden auf folgenden Tagungen berichtet:

a.) 17. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Mainz 1976.

b.) Meeting of the International Study Group for Research in Cardic Metabolism (European Section)-Rotterdam 1977.

c.) Sixth Congress of the Polisch Pharmacological Society-Katowice (Poland) 1977.

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | METHODE | 8 |
| 2.1. | Funktionelle Messungen | 8 |
| 2.1.1. | Präparation des isolierten Herzvorhofs | 8 |
| 2.1.2. | Versuchsanordnung | 10 |
| 2.1.2.1. | Muskelhalterung | 10 |
| 2.1.2.2. | Muskelbad mit gasgetriebenem Flüssigkeitsumlauf | 12 |
| 2.1.2.2.1. | Prinzip der Oxigenierung des Nährmediums | 12 |
| 2.1.2.2.2. | Präparierkammer | 14 |
| 2.1.2.2.3. | Versuchsdoppelkammer | 14 |
| 2.1.2.2.4. | Inkubationsapparatur für unbelastete Herzvorhöfe | 16 |
| 2.1.2.3. | Zusammensetzung der Nährlösung | 17 |
| 2.1.2.4. | Messung der Kontraktionsarbeit | 18 |
| 2.1.2.4.1. | Prinzip zur Messung der Kontraktionsarbeit | 19 |
| 2.1.2.4.2. | Eichung des Versuchaufbaues | 21 |
| 2.1.2.4.2.1. | Der Blattfeder | 21 |
| 2.1.2.4.2.2. | Übertragung der Federauslenkung auf den Schreiber | 21 |
| 2.1.2.4.3. | Berechnung der Kontraktionsarbeit | 22 |
| 2.1.2.4.3.1. | Arbeit pro Schlag | 23 |
| 2.1.2.4.3.2. | Arbeit pro Stunde | 24 |
| 2.1.2.5. | Elektrische Stimulation und Versuchsablauf | 25 |

| | | |
|---|---|---|
| 2.2. | Biochemische Analysen | 29 |
| 2.2.1. | Elektrolyte | 29 |
| 2.2.1.1. | Aufarbeitung der Herzvorhöfe zur Elektrolytbestimmung | 29 |
| 2.2.1.1.1. | Gewichtsbestimmung | 29 |
| 2.2.1.1.2. | Veraschung | 29 |
| 2.2.1.2. | Eichlösungen und Bestimmung | 30 |
| 2.2.1.2.1. | Prinzip der Bestimmung | 30 |
| 2.2.1.2.2. | Verfahren der Bestimmung | 31 |
| 2.2.1.2.3. | Eichlösungen | 31 |
| 2.2.1.2.4. | Messung der Proben | 34 |
| 2.2.1.3. | Berechnung der Elektrolytkonzentrationen | 35 |
| 2.2.2. | Energiereiche Phosphate | 36 |
| 2.2.2.1. | Aufarbeitung der Herzvorhöfe | 36 |
| 2.2.2.2. | Proteinbestimmung nach Lowry | 37 |
| 2.2.2.2.1. | Prinzip der Proteinbestimmung | 37 |
| 2.2.2.2.2. | Verwendete Substanzen und Lösungen | 38 |
| 2.2.2.2.3. | Arbeitsvorgang zur Proteinbestimmung | 38 |
| 2.2.2.2.4. | Ansatz zur Proteinbestimmung | 39 |
| 2.2.2.2.5. | Eichwerte | 40 |
| 2.2.2.2.6. | Berechnung des Proteingehalts | 40 |
| 2.2.2.3. | Creatinphosphat und ATP Bestimmung | 42 |
| 2.2.2.3.1. | Prinzip der Reaktion | 42 |
| 2.2.2.3.2. | Verwendete Substanzen und Lösungen | 43 |
| 2.2.2.3.3. | Ansatz zur Bestimmung | 44 |
| 2.2.2.3.4. | Berechnung des ATP- und Creatinphosphatgehalts | 45 |

| | | |
|---|---|---|
| 2.2.2.4. | ADP und AMP Bestimmung | 46 |
| 2.2.2.4.1. | Prinzip der Reaktion | 46 |
| 2.2.2.4.2. | Verwendete Substanzen und Lösungen | 46 |
| 2.2.2.4.3. | Ansatz zur Bestimmung | 47 |
| 2.2.2.4.4. | Berechnung des ADP- und AMP-Gehalts | 48 |
| 2.2.2.4.4.1. | ADP | 48 |
| 2.2.2.4.4.2. | AMP | 49 |
| 2.2.2.5. | Creatinbestimmung | 50 |
| 2.2.2.5.1. | Prinzip der Reaktion | 50 |
| 2.2.2.5.2. | Verwendete Substanzen und Lösungen | 50 |
| 2.2.2.5.3. | Ansatz zur Creatinbestimmung | 51 |
| 2.2.2.5.4. | Berechnung des Creatingehalts | 52 |
| 2.2.2.6. | L — Laktatbestimmung | 53 |
| 2.2.2.6.1. | Prinzip der Reaktion | 53 |
| 2.2.2.6.2. | Verwendete Substanzen und Lösungen | 54 |
| 2.2.2.6.3. | Ansatz zur L — Laktatbestimmung | 54 |
| 2.2.2.6.4. | Berechnung des Laktatgehalts | 56 |
| 2.3. | Sauerstoffverbrauchsmessungen | 58 |
| 2.3.1. | Berechnung des Nutzeffektes | 58 |
| 2.4. | Statistik | 59 |
| 3. | Ergebnisse | 60 |
| 3.1. | Funktionelle Messungen | 60 |
| 3.1.1. | Untersuchungen bei Normoxie | 60 |
| 3.1.1.1. | Kraft-Frequenzbeziehungen bei elektrisch gereizten linken Herzvorhöfen bei verschiedenen Temperaturen | 60 |
| 3.1.1.2. | Vergleich der Kontraktionsarbeit bei gleichbleibender Frequenz von 0,5 Hz bei verschiedenen Temperaturen | 62 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.1.1.3. | Ermüdung der Kontraktionskraft bei Normoxie in Abhängigkeit von der Zeit | 65 |
| 3.1.1.3.1. | Versuchstemperatur 38,5°C | 65 |
| 3.1.1.3.2. | Versuchstemperatur 35°C | 67 |
| 3.1.1.3.2.1. | Mit einer Schlagfrequenz von 0,5 Hz bei elektrisch gereizten linken Herzvorhöfen | 67 |
| 3.1.1.3.2.2. | Spontanschlagende Herzvorhöfe mit intaktem Sinusknoten | 69 |
| 3.1.2. | Untersuchungen bei akuter Anoxie | 71 |
| 3.1.2.1. | Die Zeit bis zum Erlöschen der Kontraktionskraft elektrisch gereizter linker Herzvorhöfe nach akuter Anoxie (Anoxietoleranz) in Abhängigkeit von Frequenz und Temperatur | 71 |
| 3.1.2.2. | Der Anoxietest | 74 |
| 3.1.2.2.1. | Verlauf und Beeinflußbarkeit der Kontraktionskraft in Anoxie bei 35°C und 0,5 Hz und folgender Normoxie (Anoxietest) | 75 |
| 3.1.2.2.2. | g-Strophanthin mit Verlängerung der Anoxietoleranz | 78 |
| 3.1.2.2.3. | 20 mM Nicotinsäureamid (NSA) | 80 |
| 3.1.2.2.4. | Carbochromen (Intensain$^{R}$) und Na-Decanoat | 81 |
| 3.1.2.2.5. | 1 x $10^{-5}$ M Theophyllin | 85 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.1.2.2.6. | 15 mM Glukose (Endkonzentration=30mM) | 86 |
| 3.1.2.2.7. | 1 mM Creatin | 86 |
| 3.1.2.2.8. | 15 mM Ribose | 87 |
| 3.1.2.2.9. | 0,1 mM Adenin | 87 |
| 3.1.2.2.10. | 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose | 88 |
| 3.2. | Biochemische Untersuchungen | 93 |
| 3.2.1. | Verschiebungen der Elektrolyt-konzentrationen des Herzvorhofes im Anoxietest bei 35°C | 93 |
| 3.2.2. | Die L — Laktatbestimmung im Anoxie-test bei 35°C | 96 |
| 3.2.2.1. | Inkubation mit 15 mM Glukose und Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin | 96 |
| 3.2.2.2. | Inkubation mit 30 mM Glukose und Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin im Anoxietest und einer Steigerung der Schlagfrequenz unter Normoxie | 98 |
| 3.2.2.3. | Laktatbildung an ruhenden unbelasteten und elektrisch gereizten Herzvorhöfen und ihre Beeinflußung durch Substrate den Adeninnucleotidsynthese und durch verschiedene cardiotone Pharmaka | 102 |
| 3.2.2.3.1. | Ruhende unbelastete Herzvorhöfe | 103 |
| 3.2.2.3.2. | Schlagende, belastete und elektrisch gereizte Herzvorhöfe | 106 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.2.3. | Die energiereichen Phosphate im Anoxietest | 111 |
| 3.2.3.1. | Die Veränderung der Gehalte energiereicher Phosphate im Anoxietest bei Inkubation mit 15mM Glukose im Nährmedium im Vergleich zur Normoxie | 111 |
| 3.2.3.1.1. | ATP | 112 |
| 3.2.3.1.2. | ADP | 112 |
| 3.2.3.1.3. | AMP | 113 |
| 3.2.3.1.4. | Adeninnucleotidpool (ATP+ADP+AMP) | 114 |
| 3.2.3.1.5. | Creatinphosphat (CP) | 114 |
| 3.2.3.1.6. | Creatin (CR) | 115 |
| 3.2.3.1.7. | Creatinpool (CP+CR) | 116 |
| 3.2.3.2. | Die Veränderung der energiereichen Phosphate ruhender, unbelasteter sowie elektrisch gereizter, belasteter Herzvorhöfe im Anoxietest und ihre Beeinflußung durch Substrate der Adeninnucleotidsynthese und durch verschiedene cardiotone Pharmaka. | 118 |
| 3.2.3.2.1. | Untersuchungen an ruhenden, unbelasteten Herzvorhöfen | 119 |
| 3.2.3.2.1.1. | ATP | 119 |
| 3.2.3.2.1.2. | ADP | 119 |
| 3.2.3.2.1.3. | AMP | 120 |
| 3.2.3.2.1.4. | Adeninnucleotidpool (ATP+ADP+AMP) | 120 |
| 3.2.3.2.1.5. | Creatinphosphat (CP) | 122 |
| 3.2.3.2.1.6. | Creatin | 123 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.2.3.2.1.7. | Creatinpool (CP+CR) | 124 |
| 3.2.3.2.2. | Untersuchungen an elektrisch gereizten belasteten Herzvorhöfen | 126 |
| 3.2.3.2.2.1. | ATP | 127 |
| 3.2.3.2.2.2. | ADP | 128 |
| 3.2.3.2.2.3. | AMP | 128 |
| 3.2.3.2.2.4. | Adeninnucleotidpool (ATP+ADP+AMP) | 131 |
| 3.2.3.2.2.5. | Creatinphosphat (CP) | 133 |
| 3.2.3.2.2.6. | Creatin (CR) | 134 |
| 3.2.3.2.2.7. | Creatinpool | 136 |
| 3.2.4. | Der Sauerstoffverbrauch von ruhenden und schlagenden Herzvorhöfen bei 35°C | 138 |
| 3.2.4.1. | Berechnung der ATP-Bildung aus der aeroben Glukoseoxidation und der aneroben Glykolyse | 144 |
| 3.2.4.1. | Energiebilanz | 145 |
| 3.2.4.2.1. | Unbelastete, ruhende Herzvorhöfe bei 35°C und Anwesenheit von 15 mM Glukose im Nährmedium | 145 |
| 3.2.4.2.2. | Elektrisch gereizte linke Herzvorhöfe bei 35°C und 0,5 Hz in Anwesenheit von 15 mM Glukose im Nährmedium | 147 |
| 3.2.4.2.3. | Energiebilanz von ruhenden unbelasteten und schlagenden (0,5 Hz) belasteten(500 mp) Herzvorhöfen unter Normoxie und Anoxie mit Einbeziehung der Veränderung der energiereichen Phosphate zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4 | 151 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.2.4.2.3.1. | Bei ruhenden unbelasteten Vorhöfen | 151 |
| 3.2.4.2.3.2. | Bei schlagenden belasteten Vorhöfen | 152 |
| 4. | DISKUSSION | 154 |
| 4.1. | Abnahme der Kontraktionskraft in Normoxie bei zunehmender Versuchsdauer | 154 |
| 4.2. | Anoxietoleranz und Anoxietest | 162 |
| 4.2.1. | Verlauf der Kontraktionskraft im Anoxietest bei 0,5 Hz und 35°C | 163 |
| 4.2.2. | Anaerobe Glykolyse | 164 |
| 4.2.2.1. | Steigerung der Glykolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit | 167 |
| 4.2.3. | Die Veränderungen der energiereichen Phosphate im Anoxietest | 169 |
| 4.2.3.1. | Adeninnucleotide | 171 |
| 4.2.3.2. | Creatinphosphat | 173 |
| 4.2.4. | Elektrolyte | 179 |
| 4.2.5. | Negative Inotropie in Anaerobiose | 186 |
| 4.2.6. | Positive und negative Einwirkung auf die Kontraktionskraft und den Stoffwechsel im Anoxietest | 189 |
| 4.2.6.1. | g-Strophanthin | 189 |
| 4.2.6.2. | Nicotinsäureamid | 190 |
| 4.2.6.3. | Theophyllin | 191 |
| 4.2.6.4. | Creatin | 192 |
| 4.2.6.5. | Glukose | 194 |
| 4.2.6.6. | Ribose | 194 |
| 4.2.6.7. | Adenin | 195 |

| | | |
|---|---|---|
| 4.2.6.8. | Adenin + Ribose | 199 |
| 4.2.6.9. | Carbochromen (Intensain$^{R}$) und Na-Decanoat | 202 |
| 4.2.7. | Anaerobe Energiegewinnung | 204 |
| 4.2.8. | Die Energiebilanz berechnet aus der ATP-Bildung bei aerober Glukose-oxidation und anaerober Glykolyse bei 35$^{o}$C und 0,5 Hz | 206 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 210 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 218 |

## Einleitung

Bereits im Altertum war das Herz das Organ, dem eine grosse Bedeutung im Lebewesen beigemessen wurde, einmal als Zentrum der "Seele" und der "Emotion", zum anderen war es bekannt, daß Leben nur bei funktionierender Herztätigkeit möglich war. Ein Herzstillstand war damals gleichbedeutend mit dem Ende des Lebens. Heute bedeutet ein Herzstillstand nicht mehr automatisch den Tod, sofern der für die Sauerstoffversorgung des Gehirns notwendige Blutkreislauf in Gang gehalten wird.

Seit der Entdeckung des Blutkreislaufes wurde versucht, die Geheimnisse der rhythmischen Kontraktion des Herzens zu enträtseln und vor allem die energetischen Voraussetzungen zu klären. Unter Verwendung isolierter spontanschlagender Herzmuskelpräparate fiel schon sehr früh auf, daß am Kaltblüterherz im Unterschied zu dem des Warmblüters auch in Sauerstoffmangel eine rhytmische Kontraktionskraft in voller Höhe aufrecht erhalten werden konnte. So schrieb 1917 W. BODENHEIMER:

> "1867 hat L.HERMANN nachgewiesen, daß die Tätigkeit des Muskels (isoliertes Froschherz) auch ohne Sauerstoffaufnahme und ohne die Gegenwart freien Sauerstoffs in dem Gewebe möglich ist; er konnte zeigen, daß in reiner Wasserstoff- oder Stickstoffatmosphäre die Erregbarkeit und Arbeitsfähigkeit eines herausgeschnittenen Froschmuskels nur langsam abnahm, und daß das aus Muskelschnee gewonnene Gas keinen auspumpbaren

Sauerstoff enthielt. Es kann wohl kaum ein Zweifel sein, daß die außerordentlich sorgfältigen Experimente auch heute in ihren Schlußfolgerungen noch Gültigkeit besitzen. Sie weisen darauf hin, daß zwischen der Sauerstoffaufnahme des durchbluteten Muskels und den zur Tätigkeit führenden Prozessen eine Reihe von Zwischenstufen existieren, die in der Zelle - natürlich nur beschränkte - Unabhängigkeit von der Sauerstoffaufnahme sichern".

Das Herz hat nach heutigen Erkenntnissen die höchste Sauerstoff-Ausschöpfung aller Organe, man spricht daher auch davon, daß es im Verhältnis zu seiner Arbeitsleistung mit Blut unterperfundiert ist. Eine ausreichende Kontraktionsleistung erfordert ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Substraten der biologischen Oxidation. Soweit wir heute wissen, konkurrieren hier freie Fettsäuren mit Substraten aus dem Kohlenhydratstoffwechsel. Die Bedeutung einer ausreichenden Energieversorgung geht klinisch aus der enormen Zunahme der coronaren Herzkrankheiten hervor, bei denen es durch Coronarsclerose zu einem lokalen Mißverhältnis zwischen Energieangebot und Energiebedarf kommt. Fällt in diesen Gebieten der Sauerstoffpartialdruck unter einen kritischen Wert ab, so setzt als einzige Energiequelle die Bildung von Laktat aus der anaeroben Glykolyse ein, wobei die endogenen Glykogenspeicher als erstes abnehmen (Glykogenolyse). Es ist verständlich, daß die Frage, unter welchen Bedingungen Herzmuskelzellen in Anoxie überleben und auch eventuell eine reduzierte

Kontraktionskraft ausüben, von verschiedenen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Methoden untersucht werden: entweder durch Unterbindung des Blutkreislaufes in vivo (zB. D.J. HEARSE und L.H. OPIE 1977) oder an isolierten Organen. Ausgangspunkt war die Beobachtung, daß das Froschherz in Anoxie über sehr lange Zeit volle Kontraktionstätigkeit ausüben kann. Erste Untersuchungen der akuten Anoxie wurden am isolierten ganzen Herzen durchgeführt, wobei der Herzmuskel des Kaltblüters vorwiegend verwendet wurde (V. WEIZSÄCKER, 1912 + 1913; W. BODENHEIMER 1917; H.FREUND und W. KÖNIG 1927).

V. WEIZSÄCKER (1912) beschäftigte sich u.a. mit der Kontraktionskraft des Froschmyocards unter Anoxie:

> "Es war die Frage, wieweit tatsächliche Unabhängigkeit der Arbeitsgröße vom Sauerstoffverbrauch besteht, wieweit quantitativ die Trennbarkeit von Oxidation und Kontraktion geht."

Allerdings liegen auch Untersuchungen aus neuerer Zeit vor, daß in Anoxie die Kontraktionskraft am Froschherz zum erliegen kommt (J. GÜNTHER, A. ODDOY und E. SCHUBERT 1976). W. SCHMID und M. SIESS (1956) fanden am Froschherzen bei Abwesenheit von Glukose einen Stillstand der Kontraktionskraft, der durch Zusatz von Glukose aufhebbar war. In Anoxie schlug das Froschherz mit gleichbleibender Amplitude wie unter Normoxie, sofern ausreichend Glukose in der Nährlösung enthalten war. Auch nach Abbau des Glykogens nach 10 Stunden reichte die anaerobe Glykolyse zur Erhaltung der Kontraktionskraft aus. Voraus-

setzung war ein häufiges Erneuern der Nährlösung am Straubschen Herzen, um eine zu starke Laktatanhäufung zu vermeiden. Bereits sehr früh wurde untersucht, ob es nicht möglich ist, auch am Warmblüter in Anoxie ein Überleben zu erreichen. Tatsächlich wurde am spontanschlagenden Herzvorhof unter Anoxie bei 30°C eine rasch zunehmende negative Inotropie beobachtet mit einem Stillstand nach 10 Minuten, auch wenn genügend Glukose im Nährmedium vorhanden war. Die anaerobe Glykolyse reichte nicht zur Erhaltung der Kontraktionskraft aus, wohl aber zum Überleben der Herzmuskelzellen, die auch noch nach 10 Stunden Anaerobiose durch Sauerstoffzufuhr wieder volle spontane Kontraktionstätigkeit nach etwa 10 Minuten zeigten. 1974 zeigten R.E.OLSON und D.A.Barnhorst am nach Langendorff perfundiertem Rattenmyocard bei Abwesenheit von Glukose im Perfusionsmedium nach 15 Minuten Anaerobiose wieder volle Kontraktionskraft nach erneuter Sauerstoffzufuhr. Ohne Glukose war die Erholung stark reduziert. Aus diesen Untersuchungen, wie auch Untersuchungen anderer Autoren, ergibt sich klar, daß außer dem endogenen Glykogen viel entscheidender eine ausreichende exogene Energiequelle in Form einer ausreichend hohen Glukosekonzentration erforderlich ist.

Das Froschherz zeigt im Unterschied zum Warmblüter eine langsame Spontanrhythimik. Es ist naheliegend, daß eine aus der anaeroben Glykolyse reduzierte Energiebereitstellung nur bei einer sehr langsamen Frequenz und einer reduzierten Kontraktionskraft ausreicht. Eine Erhaltung einer

reduzierten Kontraktionskraft konnte von anderen Autoren in früheren Untersuchungen nur dann festgestellt werden, wenn die Spontanfrequenz unter Einwirkung von Pharmaka gesenkt wurde (M. SIESS 1962). Unter diesen Bedingungen konnte dann auch für eine begrenzte Zeit eine positiv inotrope Wirkung unter Anaerobiose mit g-Strophanthin erzielt werden, die aber nach längstens 30 bis 40 Minuten zum Stillstand führte.

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war, an isolierten elektrisch gereizten linken Herzvorhöfen die Bedingungen zu finden, bei denen eine reduzierte anaerobe Kontraktionskraft über einen möglichst langen Zeitraum erhalten werden kann. Mit einem solchen Test könnte die pharmakologische Beeinflussung der anaeroben Kontraktionskraft oder des Stoffwechsels (Geschwindigkeit der anaeroben Glykolyse, energiereiche Phosphatkonzentrationen im Gewebe, Elektrolytverschiebungen) untersucht werden, um auf diese Weise für das Überleben der Herzmuskulatur in Anaerobiose neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Das erste Problem ist, daß die Kraft-Frequenzbeziehungen einmal bei wechselnder Temperatur verschieden sind (Vgl. V. KRUTA 1937), zum anderen in Abhängigkeit von der Zeit die Kontraktionskraft als Folge der Ermüdung nachläßt. Diese sogenannte "Ermüdung" ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden, so schrieb 1921 H. WIELAND:

> "Meine Auffassung von der Ermüdung des Herzens als Ausdruck einer Vergiftung stützt sich zunächst nur auf die

beiden Beweise: auf eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Symptomen der Ermüdung und denen gewisser Vergiftungen und die gleichsinnige Beeinflussung der Ermüdung und mancher Vergiftungen (nicht nur die Desoxycholatvergiftung) durch eine Reihe von Agenzien; es wird sich weiterhin darum handeln, durch geeignete Methoden das Vorhandensein eines solchen Ermüdungsgiftes im Herzen festzustellen oder auszuschließen. Über die Natur des hypothetischen Giftes können vorläufig nicht einmal Vermutungen ausgesprochen werden. Es ist anzunehmen, daß diese Substanz im Stoffwechsel des Herzens dauernd gebildet und durch Blutbestandteile (Eiweiß, Ölsäure) entfernt wird; wird das Blut völlig durch Ringerlösung ersetzt, so stockt die Entfernung, es kommt zur Anhäufung des giftigen Stoffes und dadurch zu einer Beeinträchtigung der Herztätigkeit."

Dieses hier angeführte Ermüdungsgift ist nach den heutigen Erkenntnissen die Milchsäure.

Bereits Louis Pasteur beschrieb vor mehr als 100 Jahren eine Steigerung der Glykolysegeschwindigkeit, die nach heutigen Erkenntnissen über den ATP- und ADP-Gehalt im Gewebe reguliert wird. Da ein Anstieg der Glykolysegeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur zu erwarten war, mußten die günstigsten Bedingungen für eine reduzierte Kontraktionskraft hinsichtlich der Frequenz und Temperatur gefunden werden. Am einfachsten erschien es, die Anoxietoleranz zu bestimmen, d.h. die Zeit bis zum Erlöschen der meßbaren Kontraktionskraft. Da dieser Para-

meter jedoch von mehreren Faktoren abhängig ist (u.a. der Glykogengehalt des Herzmuskels, die Dicke des Präparates usw.) bevorzugten andere Autoren die Erholungszeit und das Ausmaß der Erholung (Recovery) nach bestimmten Erstickungszeiten (W.H. DANFORTH, S. NAEGLE und R.J.BING 1960; W.C. YANG 1963; R.G. PENN 1965; D.J. HEARSE und E.B. CHAIN 1972), gemessen an den verschiedensten Parametern.

Die Untersuchungen gliedern sich in einen funktionellen und einen biochemischen Teil. Der funktionelle Teil befaßt sich mit der Erscheinung der Ermüdung und darauf aufbauend der Kraft-Frequenzbeziehung bei verschiedenen Temperaturen mit der Ausarbeitung eines funktionellen Anoxietestes. Den biochemischen Teil bildet die Bestimmung der Elektrolyte, der energiereichen Phosphate und der Laktatproduktion unter der gefundenen, wenn auch stark reduzierten Kontraktionskraft.

Bei gleichzeitigen Sauerstoffverbrauchsmessungen unter gleichen Bedingungen wie unter Anaerobiose (35°C bei 0,5 Hz) wurde ein Vergleichsmaßstab für die Energiebilanz gefunden.

Nach Ausarbeitung dieser Grundlagen wurde durch inotrop wirkende Pharmaka und Substrate der Adeninnucleotidsynthese und des Creatinstoffwechsels untersucht, in wieweit in der Anaerobiose Kontraktionskraft und Stoffwechsel zu beeinflussen sind.

## 2. METHODEN

### 2.1. Funktionelle Messungen

#### 2.1.1. Präparation der isolierten Herzvorhöfe

Als Versuchstiere wurden männliche, junge Meerschweinchen vom gleichen Züchter mit einem mittleren Lebendgewicht von 200 bis 250 Gramm verwendet. Die Tiere erhielten neben dem Trockenfutter der Firma ALTROMIN (Lage/Lippe) Karotten und Salatblätter, Trinkwasser stand ständig zur Verfügung.

Die Präparation der Herzvorhöfe erfolgte, mit kleineren Modifikationen, wie schon von W. SCHMID und M. SIESS (1956) beschrieben. Die Tiere wurden zuerst gewogen, dann mittels eines Bolzenschußgerätes getötet und auf ein Präparierbrett aufgespannt. Nach einem Medianschnitt von der Symphyse bis zum cranialen Ende des Brustbeines wurde das Fell seitlich bis zu den Axillarlinien abpräpariert und zum Ausbluten die V. Subclavia eröffnet. Dann wurde die Bauchdecke median von der Symphyse bis zum caudalen Ende des Brustbeines aufgeschnitten, am Rippenbogen nach lateral abgetrennt und das Zwerchfell von dorsal nach frontal am Rippenbogen entlang abgetrennt und so der Thorax eröffnet. Dieser wurde dann an den Knorpel-Knochengrenzen der Rippen beiderseits nach cranial bis zu den Schlüsselbeinen aufgeschnitten, sodaß die Thoraxwand nach vorne oben aufgeklappt werden konnte. Nach Erfassen der Herzspitze mit einer Pinzette wurde diese zum Ausbluten der Herzlumens abgeschnitten. Nun wurden die Gefäße

und das hintere Mediastinium von der Herzmuskulatur abgetrennt. Nach dem Herauslösen aus dem umgebenden Bindegewebe wurde das Vorhofpräparat in einer Petrischale mit auf 35°C erwärmter Krebs-Henseleitlösung mit 15mM Glukose blutleer gespült, und dann in eine eigens hierfür entwickelte Präparierkammer nach H.J. MENSING (1977) überführt. Da diese Präparierkammer (siehe Abb.3) temperiert ist und auch für eine ausreichende Sauerstoffversorgung gesorgt ist, konnten hier alle Kammermuskelgefäß- und Bindegewebsreste sorgfältig entfernt werden. Die beiden Vorhöfe wurden nun getrennt, der linke Vorhof wurde auf der einen Seite mittels einer kleinen Serre-fine aus Silber-Kupferlegierung (Degussa Nr. 900/000/0,1 mm Ø) gefaßt, während das andere Ende in der Muskelhalterung (Abb.1) befestigt wurde.

Am Ende des Versuches wurden die Herzvorhöfe dem Bad entnommen, 60 Sekunden zwischen 2 Lagen Fließpapier zwischen 2 Plexiglasplatten mittels eines konstanten Gewichtes von 150 g abgetupft, um die Nährlösung weitgehend aus dem Extrazellulärraum zu entfernen. Hiernach wurden die Herzvorhöfe auf einer Satoriuswaage, Model 2434 (Empfindlichkeit 0,01 mg) gewogen. Das mittlere Feuchtgewicht betrug $33{,}01 \pm 0{,}6$ mg ($n = 285$).

Für die Elektrolytbestimmung wurde in gleicher Weise verfahren und die Herzvorhöfe wie später beschrieben weiter verarbeitet. Zur Bestimmung der energiereichen Phosphate ATP, ADP, AMP, Creatinphosphat und Creatin wurden die Herzvorhöfe nach Beendigung des Versuches so schnell wie

möglich aus der Muskelhalterung herausgenommen. In einer mittels flüssigem Stickstoff auf -196°C abgekühlten Zange nach Wollenberger wurden die Herzvorhöfe eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. In diesem Falle wurden die Ergebnisse auf den Proteingehalt bezogen. Die Proteinbestimmung wurde nach O.H.LOWRY (1951) durchgeführt. Der mittlere Proteingehalt der linken Herzvorhöfe betrug 4,03 ± 0.07 mg (n=157).

2.1.2. Versuchaanordnung

2.1.2.1. Muskelhalterung

Das Herzvorhofpräparat wurde entsprechend Abb.1 in einer Halterung aus zwei Plexiglashälften eingespannt. Durch das Zusammenfügen der beiden Plexiglashälften wurde das Herzohr des linken Vorhofes fixiert, wobei gleichzeitig der Kontakt mit einer Platinelektrode (=Anode) hergestellt wurde. Das andere Teil des Vorhofpräparates wurde diagonal gegenüber dem ersten Fixpunkt an einer Klammer aus Silberfederdraht befestigt. Nach Einsetzen der Muskelhalterung in den Glasschliff erfolgte die Messung der Kontraktion des linken Vorhofes über einen an der Serrefine befestigten Seidenfaden, der zu einer geeichten Blattfeder eines induktiven Wegaufnehmers führt. Die zweite Reizelektrode (= Kathode) aus Platindraht liegt in der zweiten Hälfte der Muskelhalterung, sodaß der Vorhof durch eine Stromschleife im Nährmedium erregt wurde.

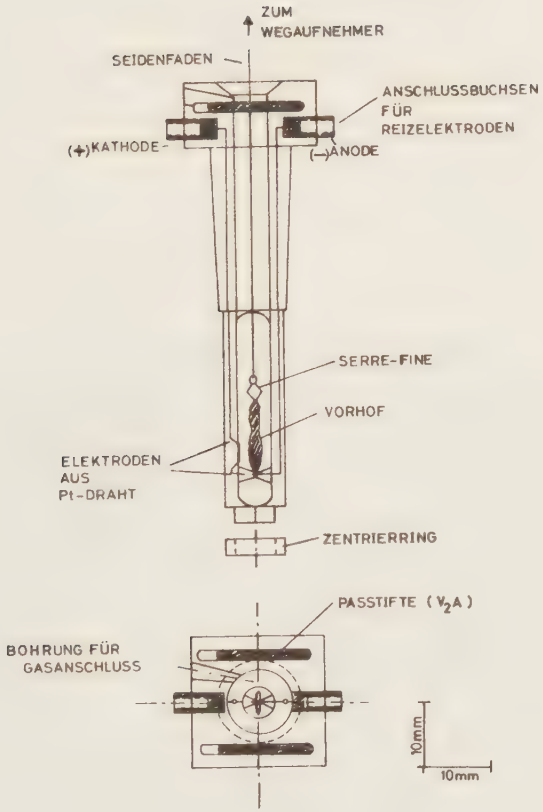



Abbildung 1: Schematische Darstellung der zweiteiligen Vorhofhalterung aus Plexiglas

2.1.2.2. Muskelbad mit gasgetriebenem Flüssigkeitsumlauf.

2.1.2.2.1. Prinzip der Oxygenierung der Nährlösung.

Da bei unseren Versuchen kleinste Änderungen der Kontraktionskraft gemessen werden können, stören aufsteigende Gasbläschen die Messung. Um diesen Störfaktor auszuschalten, wurde von H.J. MENSING (1977) folgendes Prinzip ausgearbeitet:

Der Gasstrom wird in einer D3 Glasfritte in kleine Gasbläschen aufgeteilt, die in der Oxygenatorkammer aufsteigen und die Nährlösung mit emporreißen. Durch das Passieren von Engstellen wird eine Turbulanz erzeugt, durch die eine schnellere Oxygenierung der Nährlösung erreicht wird. Die Oxygenatorkammer ist mit der Vorhofkammer mittels 2 Kapillaren verbunden. Die mit Sauerstoff gesättigte Nährlösung strömt nun durch die obere Kapillare in die Vorhofkammer, umspült den Herzvorhof und strömt dann durch die untere Kapillare wieder zurück in die Oxygenatorkammer. Auf diese Art und Weise wird der Herzvorhof immer mit Sauerstoff, Nährstoffen und den zugegebenen Pharmaka versorgt. Durch die relativ hohe Strömungsgeschwindigkeit wird für eine geringe hydrodynamische Grenzschichtdicke (Unstirred layer) an der Oberfläche des Präparates gesorgt, ohne daß durch die aufsteigenden Gasbläschen in der Oxygenatorkammer Störungen in der Vorhofkammer verursacht werden. Die zugegebenen Pharmaka werden durch den Umlauf binnen Bruchteilen von Sekunden ver-

teilt, wodurch eine homogene Konzentration des Pharmakons im Nährmedium gewährleistet wird.

Um die Diffusion von Luft in das Nährmedium zu verhindern, wird das ausströmende Gas aus der Oxygenatorkammer oberhalb des Flüssigkeitsspiegels in die Vorhofkammer eingeleitet. Dies ist von besonderer Bedeutung während der Versuche unter anaeroben Bedingungen.

Messungen mit einer Sauerstoffelektrode haben ergeben, daß nach dem Umschalten von Carbogen auf $N_2/CO_2$ der $PO_2$ in wenigen Sekunden auf Werte unterhalb der Meßgrenze zurückgeht und somit absolute anaerobe Bedingungen geschaffen werden können.

Abbildung 2: Illustration der Strömung zwischen Oxigenatorkammer und Vorhofkammer. (H.J. MENSING 1977)

2.1.2.2.2. Präparierkammer.

Für die Präparierkammer wurde das gleiche Prinzip des gasgetriebenen Flüssigkeitsumlaufs benutzt. Die Vorhofkammer wurde hier erweitert und mit einem durchlöchertem Glasboden versehen, sodaß der Vorhof während der Präparation durch das umströmende Nährmedium versorgt wird. Das ganze System ist in einem Glasmantel eingeschmolzen, der über Schlauchanschlüsse mit einem Thermostaten verbunden wurde, um während der Präparation eine konstante Temperatur zu gewährleisten.

2.1.2.2.3. Versuchsdoppelkammer mit vorgeschalteter Waschflasche

Die Versuchsdoppelkammer besteht aus zwei unabhängigen Umlaufsystemen wie unter 2.1.2.2.1. beschrieben, die ebenfalls zum Zwecke der Thermostatisierung in einem Glasmantel eingeschmolzen sind. Jedes System hat ein Fassungsvermögen von 8 ml Nährlösung. Um einen Konzentrationseffekt des Nährmediums durch den Verlust von Wasserdampf bei der Gasdurchströmung auszuschalten, wurde eine Waschflasche mit zwei unabhängigen Systemen verwendet, sodaß Carbogen und $N_2/CO_2$ unabhängig voneinander angefeuchtet wurden und die Latenzzeit beim Umschalten von einem auf das andere Gas möglichst klein war.
Pharmaka wurden mittels einer Mikrolitерspritze durch die Öffnung des Gasaustrittes in der Muskelhalterung zugegeben. Auf gleiche Art und Weise wurden die Mediumproben

für die L — Laktatbestimmung im Nährmedium entnommen.

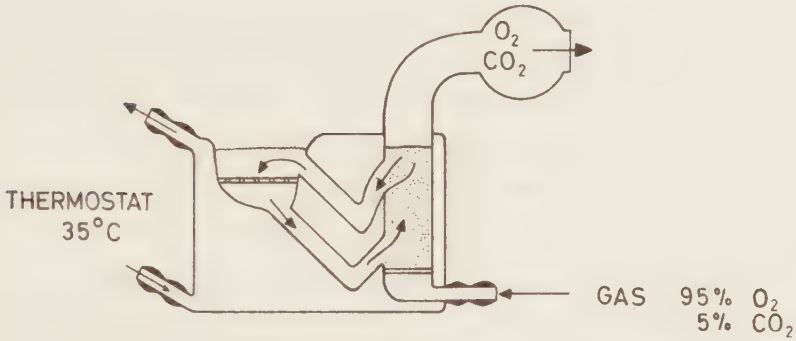



Abb. 3: PRÄPARIERKAMMER (schematische Darstellung)

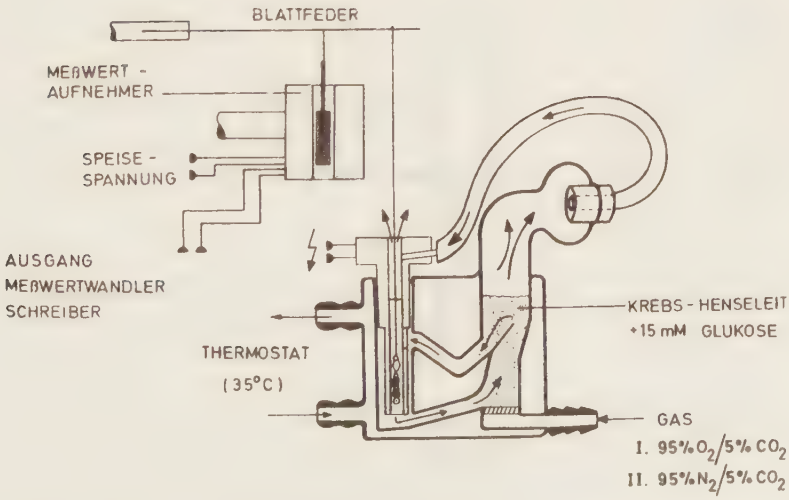



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.

2.1.2.2.4. Inkubationsapparatur für unbelastete Herzvorhöfe.

Für die Untersuchungen an ruhenden unbelasteten Vorhöfen wurde die Apparatur von U.DELABAR (1976) verwendet. Nach Präparation der linken Vorhöfe wurde an jedem Vorhof eine Serre-fine befestigt. Jeweils ein Vorhof wurde in eine Muskelhalterung eingehängt und inkubiert. Das Nährmedium konnte mit Carbogen oder $N_2/CO_2$ durchperlt werden, sodaß Untersuchungen unter Normoxie wie auch unter Anoxie durchgeführt werden konnten. Die Inkubationsgefäße wurden an einer Halterung in ein Wasserbad eingehängt und die Nährlösung in diesen Versuchen konstant auf 35°C gehalten.

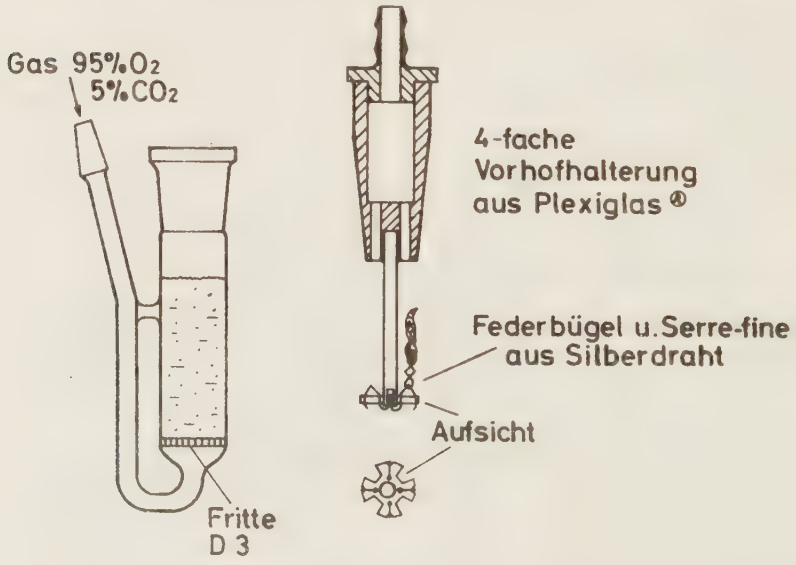



Abbildung 5: Graphische Darstellung der Muskelkammer mit Vorhofhalterung

Pharmaka wurden mittels einer Mikroliterspritze durch die Öffnung des Gasaustrittes zugegeben, auf gleiche Art und Weise wurden die Mediumproben für die Laktatbestimmung im Nährmedium entnommen. Am Ende eines jeden Versuches wurden die Vorhöfe für biochemische Analysen aufgearbeitet. (Siehe 2.2.2.1. - Aufarbeitung der Herzvorhöfe).

2.1.2.3. Zusammensetzung der Nährlösung

Für die Versuche wurde folgendes Nährmedium nach H.A.KREBS und K.H.HENSELEIT (1932) benutzt:

| Stoff | Krebs-Henseleit Lösung | | Säugetierserum |
|---|---|---|---|
| | mg % | mM | etwa Mittelwert |
| $Na^+$ | 327 | 142,2 | 320 mg % |
| $K^+$ | 23 | 5,9 | 22 " |
| $Ca^{++}$ | 10 | 2,5 | 10 " |
| $Mg^{++}$ | 2,9 | 1,2 | 2,5" |
| $Cl^-$ | 454 | 128 | 370 " |
| $PO_4^=$ | 11 | 1,1 | 10 " |
| $SO_4^=$ | 11,4 | 1,2 | 11 " |
| $HCO_3^-$ | 54 Vol % | 24 | 54 Vol % |

Zur Herstellung der Lösung wurden folgende dem Serum isotone Stammlösungen in großen Mengen vorrätig gehalten und bei +6°C aufbewahrt. (Alle Substanzen E.Merk - Darmstadt p.a.)

1) 0,9 % NaCl Lösung (0,154 M)
2) 1,15% KCl Lösung (0,154 M)
3) $CaCl_2$ Lösung (0,11 M)
4) 2,11 % $KH_2PO_4$ Lösung (0,154 M)
5) 3,82 % $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ Lösung (0,154 M)
6) 1,3 % $NaHCO_3$ Lösung (0,154 M) - nach der Herstellung eine Stunde mit $CO_2$ durchperlt.

Aus den Stammlösungen stellten wir nach folgender Formel das Nährmedium zusammen:

100 Teile Lösung 1
4 Teile Lösung 2
3 Teile Lösung 3
1 Teil Lösung 4
1 Teil Lösung 5
21 Teile Lösung 6

Nach dem Mischen wurde für 10 Minuten Carbogen durch das Medium geleitet, bis sich ein konstanter pH von 7,4 eingestellt hat. Verhindert man das Entweichen der Kohlensäure, ist die Lösung für einige Wochen haltbar. Dennoch wurde das Nährmedium jede Woche neu angesetzt.
Weiterhin enthielt das Medium 15 mM Glukose.

2.1.2.4. Messung der Kontraktionsarbeit.

Die Aktion des spontanschlagenden oder elektrisch ge-

reizten Herzmuskelpräparates wurde außerhalb der Kammer mittels einer geeichten Blattfeder und einem induktiven Wegaufnehmer (Firma Erichsen, Serie 601 Typ 5) registriert. Die Impulse die durch die Kontraktion des Herzmuskelpräparates verursacht wurden, wurden auf einen Differential-Transformator übertragen und von einem Meßwertwandler mit Ratemeter aufgetrennt in:

a) die Frequenz (Hz)

b) die Amplitude

Die systolische und diastolische Endspannung wurde über einen Meßwertwandler auf 2 getrennte Kanäle eines Rikadenki-Mehrkanalschreibers registriert bei gleichzeitiger Registrierung der Frequenz.

2.1.2.4.1. Prinzip zur Messung der Kontraktionsarbeit

Die Arbeit des Herzmuskels in vivo ist der registrierten Arbeit gegen eine Feder hinsichtlich der Spannungs- und Wegverhältnisse ähnlich. In vivo kommt es im Ventrikel zuerst unter sehr geringer Verkürzung (S) des Hohlmuskels gegen stark ansteigenden Druck (P) - ähnlich dem zunehmenden Widerstand der Feder - zur isometrischen Spannungszunahme. Sobald der Ventrikeldruck den diastolischen Aortendruck gerade übersteigt, öffnen sich die Seminularklappen und unter nunmehr starker Verkürzung wird der Kammerinhalt gegenüber weiter ansteigendem Druck ausgeworfen. Im ersten Falle handelt es sich vergleichsweise um Arbeit gegen eine Feder mit großem $\Delta P$ bei kleinem $\Delta S$, im zweiten Fall um Arbeit gegen eine Feder mit klei-

nem $\Delta P$ bei großem $\Delta S$

$\frac{\Delta P}{\Delta S}$ = groß (isometrischer Typ)

$\frac{\Delta P}{\Delta S}$ = klein (isotonischer Typ)

In vitro verläuft die Kontraktion des Herzmuskelpräparates in folgender Weise:
Eine Spannung, in unseren Versuchen 500 mp, ist vorgegeben, unter welcher der Muskel in der Diastole steht. Bei der Kontraktion erhöht sich diese Spannung mit zunehmender Auslenkung der Feder, doch ist diese im Verhältnis zur Spannungszunahme gering und nähert sich dem isometrischen Typ. Die Arbeit ($A_s$), die der Herzvorhof bei der Auslenkung der Feder pro Schlag durchführt, ergibt sich aus der Vorspannung, der Auslenkung der Feder und der sich während der Auslenkung erhöhenden Spannung.
Da die Herzvorhöfe so aufgehängt worden sind, daß der größte diagonale Durchmesser erfaßt wird, werden bei der Belastung hauptsächlich die Herzmuskelzellen (-fasern), die in dieser Richtung liegen oder spiralförmig dazu verlaufen, für die meßbare Kontraktionsarbeit herangezogen. Als Vektor wird diese Arbeit registriert. Anteilmäßig überwiegen diese Muskelfasern denjenigen, die quer zur Spannungsrichtung verlaufen und daher wenig oder keine Arbeit leisten. Die optimale Herzleistung hängt daher außer von der Präparation von der Befestigung der Präparate im System ab und ist somit relativ. Schwankungen des Nutzeffektes von Präparaten dürfen darauf beruhen, Änderungen der Leistung oder Arbeit am gleichen Präparat

können aber berechnet und verglichen werden.

2.1.2.4.2. Eichung des Versuchaufbaues

2.1.2.4.2.1. Eichung der Blattfeder

Zur Berechnung der geleisteten Arbeit des Herzvorhofes war eine genaue Bestimmung der Federkonstanten notwendig. Dazu wurde die Feder mit geeichten Gewichten belastet. Die relativ kleine Auslenkung der Blattfeder wurde im Bereich von 500-2000 mg auf 1/10 mm genau gemessen. Dabei zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen Auslenkung und angewendeter Spannung der Feder. Die Federlänge wurde so eingestellt, daß bei einer Belastung von 1000 mg die Feder um 1 mm ausgelenkt wurde. Dieser Wert liegt den späteren Berechnungen zugrunde. Die Kraftübertragung vom Herzvorhof auf die Blattfeder erfolgte direkt von der an der Spitze des Vorhofes befestigten Silberklammer über einen Faden auf die Feder.

2.1.2.4.2.2. Übertragung der Federauslenkung auf den Schreiber

Zur Eichung des Schreibers wurde die reale Federauslenkung unter verschiedenen Gewichten in 500 mg Abständen auf den Schreiber übertragen und die jeweiligen Schreiberausschläge registriert. Schreiber und das Weg/Zeit Funktionsmessgerät wurden aufeinander abgestimmt, sodaß die Linearität im Messbereich (0 bis 2000 mp) gewährleistet war. Dieses wird in der folgenden Abbildung illustriert.

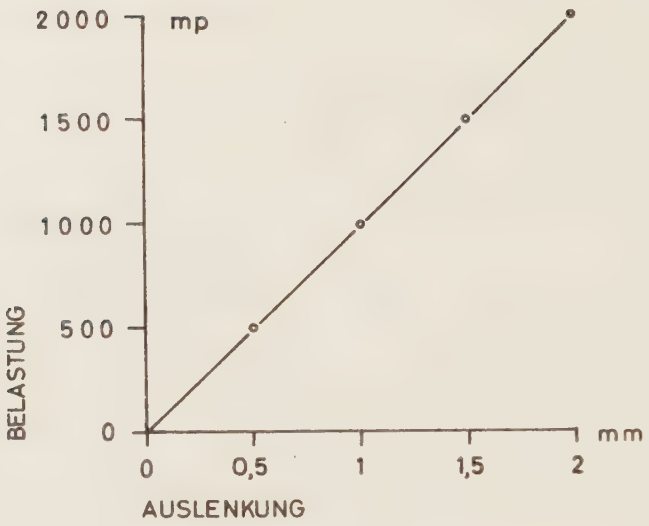



Abb. 6 : EICHUNG DER BLATTFEDER

2.1.2.4.3. Berechnung der Kontraktionsarbeit.

Zwischen den Begriffen "Arbeit" und "Leistung" wird in der Physik unterschieden:

$$\text{Arbeit} = \text{Kraft} \times \text{Weg}$$

$$\text{Leistung} = \frac{\text{Kraft} \times \text{Weg}}{\text{Zeit}} = \frac{\text{Arbeit}}{\text{Zeit}}$$

Will man bei der Berechnung der geleisteten Arbeit oder Leistung am Herzmuskel in gleicher Weise verfahren, so müßte man unter "Arbeit" die pro Systole geleistete Arbeit unter "Leistung" die pro Zeiteinheit (z.B. pro Stun-

de) geleistete Arbeit verstehen. Dies ist aber nicht ganz korrekt, da eine Systole auch ein Zeitbegriff beinhaltet, und damit Arbeit pro Schlag ebenfalls Leistung ist. Richtiger ist es in diesem Zusammenhang nicht von Leistung, sondern nur von Arbeit pro Schlag ($A_s$) zu sprechen, und Arbeit pro Stunde ($A_h$), wobei der letzte Begriff als LEISTUNG die Zahl der Systolen pro Stunde einbezieht.

2.1.2.4.3.1. Berechnung der Arbeit pro Schlag.

Ziel der Berechnung der Kontraktionsarbeit ist es, die Beziehung zwischen Muskelarbeit und resultierenden Schreiberausschlägen durch vorhergehende Eichung rechnerisch zu erfassen, und somit den Abstand zwischen dem systolischen und diastolischem Schreiberausschlag zur direkten Meßgröße der Kraft zu machen.

Es kann jedoch eine "sichtbare" Arbeit von einer "unsichtbaren" unterschieden werden. Während die "sichtbare Arbeit" mit einer Auslenkung der Blattfeder einhergeht (auxotonische Kontraktion), muß die "unsichtbare Arbeit" zur Überwindung der Vorspannung aufgebracht werden (isometrische Kontraktion). Bei der Kontraktion des Herzmuskelpräparates entwickelt sich in den kontraktilen Elementen des Muskels eine Spannung, welche der diastolischen Dehnung entgegengerichtet ist (unsichtbare Arbeit). Erst wenn diese überwunden ist bewegt sich die Blattfeder (sichtbare Arbeit).

Bei der Berechnung der flächenhaft dargestellten Arbeit

erhält man mit Hilfe der Eichmessungen die folgende Gleichung:

$$A_s = \frac{Dxf^2}{2} \times (a_2^2 - a_1^2) \text{ mm x mp}$$

$$= 0{,}05 \times (a_2^2 - a_1^2) \text{ mm x mp}$$

Wobei D = Federkonstante = 1 mm/1000 mp

f = Schreiberfaktor

$a_2$ = Abstand zwischen systolischer Linie und der O-Linie

$a_1$ = Abstand zwischen diastolischer Linie und der O-Linie

Da es bei unseren Versuchen nur auf Vergleiche der geleisteten Arbeit ankam, wurde zur Vereinfachung keine Berechnung nach dem SI System durchgeführt. Bei der Berechnung der Kontraktionsarbeit wurde die Ruhedehnungskurve eines jeden Präparates und die aus der Elastizität resultierenden Abweichung der errechneten Arbeit nicht berücksichtigt. Dieser prinzipielle Fehler wurde wegen fehlender Registriermöglichkeiten in Kauf genommen, zumal es sich nur um vergleichende und keine absoluten Werte handelte.

2.1.2.4.3.2. Berechnung der Arbeit pro Stunde.

Die Arbeit pro Stunde, bzw. die Zahl der Systolen pro Stunde, entspricht der Leistung ($A_h$). Hierbei geht die Frequenz mit in die Berechnung ein, sodaß sich die Formel wie folgt verändert.

$$A_h = A_s \times F \times 10^{-4} \times 60$$

$$= A_s \times F \times 0{,}006 \; \frac{cm \times p}{h}$$

Wobei $A_s$ = Geleistete Arbeit pro Schlag ist

$F$ = Die Anzahl der Systolen pro Minute (Frequenz)

$10^{-4}$ = Umrechnung der Dimensionen

60 = Umrechnung von Minute auf Stunde

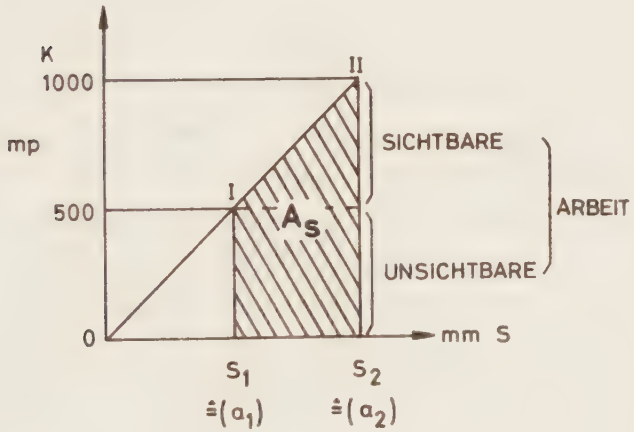



Abb. 7: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ARBEITSBERECHNUNG

2.1.2.5. Elektrische Stimulation und Versuchsablauf.

Der Einfluß der spontanen Eigenfrequenz des Schrittmachers wurde durch die Verwendung von linken, elektrisch stimulierten Herzvorhöfen ausgeschaltet (Reizgerät hergestellt vom Zentralen Entwichlungslabor der Universität Marburg).

Die Impulslänge wie auch die Stromstärke konnte von 0,1 bis 10 m Sekunden und von 0,2 bis 20 mA stufenlos eingestellt werden. Die Vorhöfe wurden nach einer kurzfristigen Einstellphase von einer Impulslänge von 0,7 m Sekunden auf 0,5 m Sekunden für die ganze Versuchsdauer eingestellt. Der bei dieser Impulslänge gefundene Schwellenwert der Stromstärke wurde um 10% überschritten. Dieser Wert lag zwischen 0,4 und 0,6 m A. Die Frequenz konnte von 0,25 Hz bis 6 Hz stufenlos eingestellt werden, für Versuche unter anaeroben Bedingungen wählten wir eine Frequenz von 0,5 Hz. Die Frequenz, Impulslänge und Stromstärke wurden während des ganzen Versuches nicht verändert.
Direkt nach der Präparation und der Fixation in der Muskelhalterung wurden die Vorhöfe eine halbe Stunde in dem ersten System der Versuchsdoppelkammer bei einer Vorspannung von 500 mp mit einer Frequenz von 0,5 Hz gereizt ( = Vorbereitungszeit). Danach wurden sie in das zweite System der Versuchsdoppelkammer umgehängt ( = Zeitpunkt 0 des Versuches), in der sie eine weitere Stunde bei einer Vorspannung von 500 mp schlugen. Die Kontraktionskraft, die am Ende dieser Stunde zum Zeitpunkt 1 und Meßpunkt 1 erreicht wurde, wurde als Ausgangswert unter Normoxie (Begasung des Nährmediums mit 95% $O_2$/ 5% $CO_2$) bezeichnet und diente als Kontrollwert ( = 100%) für den weiteren Versuchsverlauf. Bei den Versuchen unter anaeroben Bedingungen wurde hier von Normoxie auf strenge anaerobe Bedingungen umgeschaltet (Begasung des Nährmediums mit 95% $N_2$ / 5% $CO_2$). 20 Minuten nach dem Umschalten von

Normoxie auf Anoxie zum Zeitpunkt der geringsten entwikkelten Kontraktionskraft ( = Meßpunkt 2) wurden Proben zur L(+)-Laktatbestimmung entnommen. Pharmaka wurden nach einer Stunde Anoxie, also zum Zeitpunkt 2 bzw. Meßpunkt 3 des Versuches zum Nährmedium hinzugefügt. Zu diesem Zeitpunkt hatte die anaerobe Kontraktionskraft wieder ein höheres Gleichgewicht erreicht. Nach 2 Stunden Anoxie ( = Zeitpunkt 3 und Meßpunkt 4 des Versuches) und einer Gesamtversuchsdauer von 3 Stunden waren die Versuche beendet, die Vorhöfe wurden aus der Muskelhalterung entfernt und für biochemische Analysen aufgearbeitet.
Bei den funktionellen Untersuchungen zur Veränderung der Kontraktilität während der Anoxie wurde genauso verfahren wie oben beschrieben, die Versuchsdauer erstreckte sich dann jedoch über mehrere Stunden ( = Anoxietoleranz).
Der Gasstrom von 95% $N_2$/ 5% $CO_2$ und Carbogen (95% $O_2$ / 5% $CO_2$) konnte mittels 2 Flowmetern der Firma Krohne Duisburg reproduzierbar auf 6,0 L/Stunde eingestellt werden.

| Meßpunkt | Zeitpunkt | Beschreibung |
|---|---|---|
| | 0 | 1/2 Stunde nach der Präparation Vorbereitungszeit) = Versuchsbeginn |
| 1 | 1 | 1 Stunde nach dem Versuchsbeginn unter Normoxie vor dem Umschalten auf Anoxie |
| 2 | | ca. 15 bis 25 Minuten nach dem Umschalten von Normoxie auf Anoxie zum ZP der geringsten entwickelten Kontraktionskraft |
| 3 | 2 | 1 Stunde nach dem Umschalten auf Anoxie |
| 4 | 3 | 2 Stunden nach dem Umschalten auf Anoxie |

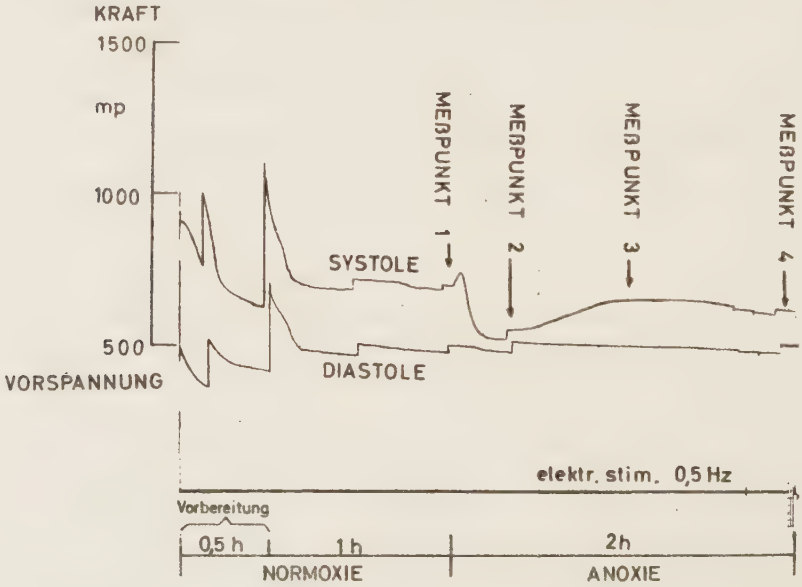



Abb.8: Originalkurve zur Demonstration des Versuchsablaufes und der verschiedenen Meßpunkte.

## 2.2. Biochemische Analysen

### 2.2.1. Elektrolyte

#### 2.2.1.1. Aufarbeitung der Herzvorhöfe

##### 2.2.1.1.1. Gewichtsbestimmung

Nach Beendigung jedes Versuches wurde jeweils das Frischgewicht der Herzvorhöfe bestimmt. Dazu wurden 25 ml Enghals-Meßkolben aus Duran-Glas bei 100°C über Nacht getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. Anschließend wurden die Herzvorhöfe wie beschrieben 60 Sekunden lang zwischen zwei Filtrierpapierblätter (Rota, Düren; Aschegehalt 0,1 °/oo ) unter einer Platte von 150 g Gewicht gepresst, in die Meßkolben überführt und diese erneut gewogen. Sämtliche Wägungen wurden mit einer SATORIUS-Präzisionswaage Typ 2434 durchgeführt (Empfindlichkeit 0,01 mg). Um Kontamination mit Fett und Feuchtigkeit zu vermeiden, wurden die Meßkolben nur mit einer trockenen Holzklammer berührt, die ausschließlich dazu benutzt wurde.

##### 2.2.1.1.2. Veraschung

Die für die Atom-Absorptionsphotometrie (im folgenden als AAS abgekürzt) notwendige flüssige Phase der Probe kann schnell und ohne Materialverlust durch Veraschung mit konzentrierter Schwefelsäure hergestellt werden (BURCK 1961). In den Kolben mit dem Vorhof wurden 0,5 ml konz. $H_2SO_4$ zugegeben. Nach Erhitzen des Kolbens für 10 Minuten auf etwa 180°C war das gesamte Vorhofgewebe in der Säure gelöst. Anschließend wurde zu der abgekühlten Lösung

tropfenweise $H_2O_2$ (30%) zugegeben, bis sie vollkommen farblos war. Dann wurde der Lösung 1 ml Lanthannitrat (25 mM), 5 ml Ammoniumnitrat (5%) und 3 ml EDTA (1M) zugesetzt, anschließend wurde der Kolben bis zur 25 ml Eichmarke mit Aqua Bidest aufgefüllt.

2.2.1.2. Eichlösungen und Bestimmungen

Der Elektrolyt-Gehalt der einzelnen Proben wurde durch AAS gemessen.

2.2.1.2.1. Prinzip der Bestimmung

Atome können nur ganz bestimmte Energiezustände annehmen. Nach Anregung durch Stoßprozesse oder Absorption von Lichtquanten gehen Atome unter Aussendung eines charakteristischen Emmisionsspektrums in den Grundzustand über. Atome der gleichen Art, die selber im Grundzustand vorliegen, können genau dieses Spektrum absorbieren. Darin liegt die Erklärung für die Spezifität und Selektivität der Methode. Verschiedene Spektrallinien werden hierbei unterschiedlich stark absorbiert. Man kennt für die einzelnen Elemente Linien, die besonders stark absorbiert werden, die sogenannten Resonanzlinien. Intensitätsmessungen an der Resonanzlinie vor und nach Wechselwirkung mit den Probenatomen lassen einen Rückschluß auf die Probenkonzentration im Messvolumen zu (Abb.10). Zur Erzeugung der Resonanzlinien werden Hohlkathodenlampen des jeweiligen Elementes benutzt, die Flamme sorgt für die Atomisierung der Probe.

2.2.1.2.2. Verfahren der Bestimmung

Der Gehalt an $Ca^{++}$, $Na^{+}$ und $K^{+}$ wurde an einem Atomabsorptions-Spectrophotometer der Firma Beckman Instruments (Modell 1233 mit Autolam Burner II) gemessen. Da das Modell 1233 keine Deuterium-Untergrund-Kompensation enthält, wurde zur O-Punkte-Bestimmung eine Lösung angesetzt, der die gleichen "Fremd"-Bestandteile beigemischt waren, die auch die Probenlösung enthielt.

| | | | |
|---|---|---|---|
| O-Punktlösung: | 20 ml | $H_2SO_4$ | (konz.) |
| | 10 ml | $H_2O_2$ | (30%) |
| | 40 ml | $La(NO_3)_3$ | (25 mM) |
| | 200 ml | $NH_4(NO_3)$ | (5%) |
| | 120 ml | EDTA | (1M) |

Aqua Bidest auf 1000 ml auffüllen

2.2.1.2.3. Eichlösungen

Als Eichlösung wurden jeweils 1 ppm $Ca^{++}$ (= 0,025 mMol), 10 ppm $Na^{+}$ (= 0,435 mMol) und 10 ppm $K^{+}$ (= 0,255 mMol) in eine Lösung, die dem O-Standard entsprach, gebracht. Dazu wurden Fixanal$^{R}$ - Ampullen mit 0,100 g des jeweiligen Elementes verdünnt. Alle Lösungen wurden in Polyäthylenflaschen bei pH 1 und 4°C aufbewahrt, da hierbei die Adsorbtion von Elektrolyten am wenigsten zu befürchten war.

Vorversuche hatten ergeben, daß die Kalibrationskurven in dem Proben- und Eich-Konzentrationsbereich (O-0,5 mM für $Na^{+}$ und $K^{+}$, O-0,05 mM für $Ca^{++}$) linear waren, d.h. aus den gemessenen Extinktionen konnte sofort die Konzentration des entsprechenden Ions im Probenvolumen berechnet

werden (Abb.9). Mit Hilfe der Span-Regelung konnte für die Eichkonzentration immer exakt der gleiche Extinktionswert erreicht werden.

Da Phosphate schwerlösliche Verbindungen mit zweiwertigen Ionen bilden z.B. $Ca^{++}$ und so in der Flamme das Vorliegen freier meßbarer Atome im Grundzustand verhindern (Calciumphosphate $\not\rightarrow Ca^{o}$) wurde den Proben, der Nullpunktslösung und der Eichlösung $La(NO_3)_3$ (25 mM) zugesetzt. Lanthan ist affiner zu Anionen und wirkt deshalb als Releaser. 1-molare ÄDTA-Lösung diente als Abschirmreagenz, dessen Chelat-Komplex-Bildung mit dem Probenion stabilere Probenion-Verbindungen (z.B. Calciumphosphat) verhindert. Da durch die Ionisation der relativ hohen Salzkonzentrationen im $Na^{+}$ - $K^{+}$ - Bereich ($NaCl \dashrightarrow Na^{+} + Cl^{-}$) der Flamme Energie entzogen, und damit die Flammentemperatur gesenkt wird, wurde, auch um Schwankungen in der Matrix auszugleichen, der Probe, der O-Punktlösung und dem Eichstandard $NH_4NO_3$ zugesetzt, das als Ionisationspuffer fungiert ($Me^{o} \rightleftharpoons Me^{+}$).

Das Beckman-Modell 1233 besitzt keine Untergrundkompensation mittels einer Deuteriumlampe. Es wurde daher der Untergrundeffekt, der sich durch das Vorkommen von Tröpfchen und anderen Partikeln, die ihrerseits auch Licht absorbieren, ergeben kann, durch Messungen auf einer "falschen" Linie (z.B. einer Neon-Füllgas-Linie) überprüft. Er war unterhalb der Rauschschwelle.

Zur $Na^{+}$- und $K^{+}$-Bestimmung wurden Einzelelementlampen, zur $Ca^{++}$-Bestimmung wurde eine Mg/Ca Kombinations-Hohl-

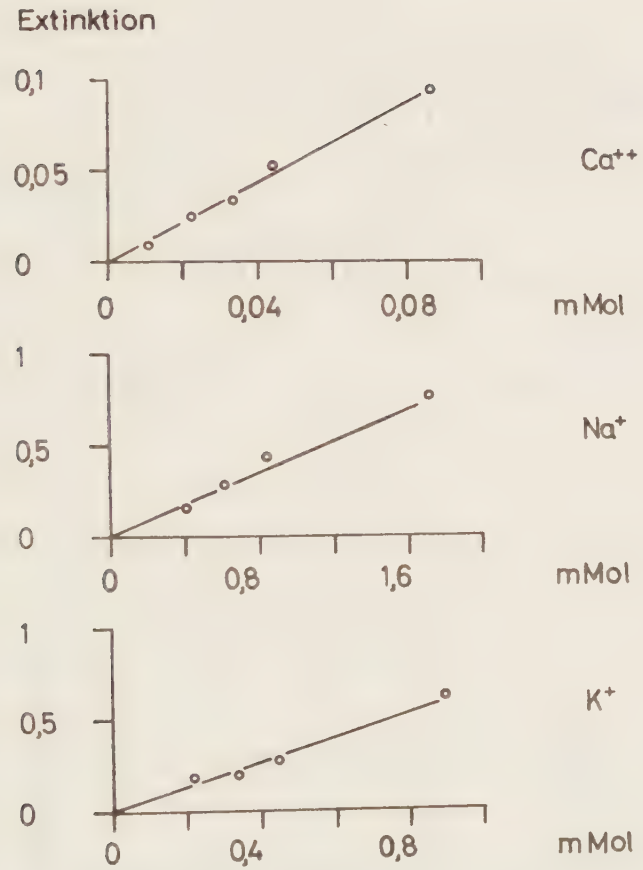



Abb.9 Eichkurven zur Überprüfung der Linearität im Bereich der Probenkonzentrationen.

kathodenlampe benutzt. Der Brenner wurde mit einem Gasgemisch aus Azetylen und synthetischer Luft betrieben ($P_{C_2H_2}$ = 0,55 kp/cm$^2$; $P_{Luft}$ = 1,5 kp/cm$^2$), die Flammentemperatur betrug ca. 2200-2400°C.

Um alle Kationen der Probe in einer Verdünnung messen zu können, wurde bei den hohen $Na^+$- und $K^+$-Konzentrationen der Brenner um $15^o$ bei $Na^+$ und um $12^o$ bei $K^+$ gegen den Strahlengang versetzt, was einer Verkleinerung der Küvettenlänge entspricht. Dadurch konnten in derselben Probe nur durch umwechseln der Lampe die geringere Calciumkonzentration nach Verstärkung gemessen werden.

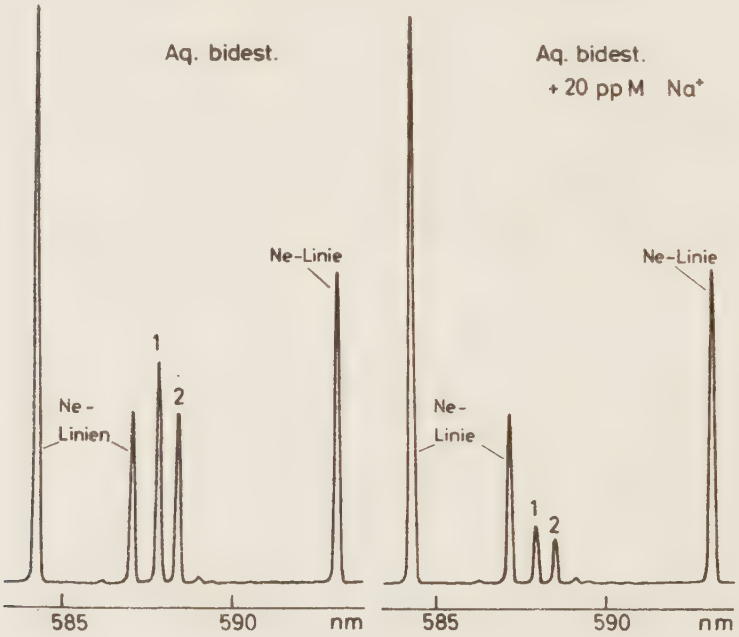



Abb.10: Emissionsspektrum einer Natrium-sensitiven Hohlkathodenlampe (1:2 = Referenzlinien)

2.2.1.2.4. Messung der Proben.

Die einzelnen Elemente wurden unter folgenden Bedingungen

gemessen:

| | | $Ca^{++}$ | $Na^{+}$ | $K^{+}$ |
|---|---|---|---|---|
| $I_{Hohlkathodenlampe}$ | mA | 12 | 15 | 30 |
| $V_{Photomultiplier}$ | V | 580 | 560 | 700 |
| Spaltbreite | geometr. mm | 0,03 | 0,03 | 0,10 |
| | spektral nm | 0,08 | 0,08 | 0,27 |
| Reverenzlinie | nm | 422,6 | 589,5 | 766,5 |

Bei Natrium und Kalium wurde die Messung automatisch gestartet, d.h. bei Überschreitung eines Schwellenwertes von etwa 2% Absorption bzw. 0,008 Extinktionen. Die Zeitkonstante wurde dann während der vorgegebenen Zeitspanne von 8 Sekunden automatisch zwischen 0,2 und ∞ Sekunden geregelt. Bei Calcium wurde die Messung manuell gestartet, das auflaufende Meßsignal wurde über 8 Sekunden integriert und auf 2 Sekunden normiert. Die Anzeige erfolgte über Meßwertspeicherung.

2.2.1.3. Berechnung der Elektrolytkonzentrationen.

Zur Berechnung der Ionenkonzentrationen pro kg Feuchtgewicht wurden fogende Formeln benutzt:

$$\text{mMol/l Probe} = \frac{\text{mMol/l Standard x Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion des Standards}}$$

und

$$\frac{\text{mMol Kation}}{\text{kg Feuchtgewicht}} = \frac{\text{mMol/l Probe x ml Probenvolumen}}{\text{g Feuchtgewicht}}$$

2.2.2. Energiereiche Phosphate.

2.2.2.1. Aufarbeitung der Herzvorhöfe.

Nach Beendigung eines Versuches wurde der Herzvorhof so rasch wie möglich aus der Muskelhalterung entnommen, zwischen den Backen einer in flüssigem Stickstoff auf -196°C vorgekühlten "Wollenbergerzange" eingefroren und in einem durchlöcherten Kunststoffgefäß bis zur Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Um das Gewebe zu pulverisieren, wurden die in flüssigem Stickstoff gekühlten linken Herzvorhöfe (20 bis 40 mg) zuerst in einem auf -196°C abgekühlten Tablettiergerät zur Tablette geschlagen ( P.C.HOFFMANN et al. 1964), um dann in 0,5 ml 0,6 N $HClO_4$ im Eisbad 3 Minuten homogenisiert zu werden. Danach wurde das Homogenat 20 Minuten in der Kälte stehen gelassen, dann bei 3000 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites Homogenisationsglas überführt, während der Proteinniederschlag mit 0,2 ml 0,6 N $HClO_4$ mittels eines Whartex - Mixers gewaschen wurde, 20 Minuten stehen gelassen und abermals 20 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert. Unter stetigem Schütteln auf dem Whartex-Mixer wurden die vereinigten Überstände mit 2,0 M $K_2CO_3$ - 0,5 M Triäthanolamin/HCl am pH-meter neutralisiert, 30 Minuten stehen gelassen und dann das ausgefallene $KClO_4$ bei 3000 U/min abzentrifugiert. Dieser Überstand wurde mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Erfogten die biochemischen Bestimmungen nicht am folgenden Tag, wurde

der neutralisierte Extrakt bei -80°C eingefroren. Der Proteinniederschlag wurde zur Proteinbestimmung nach Lowry verwendet.

Im ganzen standen etwa 750 µl neutralisierten Extraktes zur Verfügung. Bei der Messung wurde das Probenvolumen so dimensioniert, daß die Extinktionsänderung maximal 0,3 bei 340 nm betrug. Verwendet wurden:

200 µl zur ATP/CP Bestimmung

250 µl zur ADP/AMP Bestimmung

150 µl bis 250 µl zur Creatinbestimmung

Die Bestimmungen wurden im Prinzip nach BERGMEYER et al. (2. Auflage, 1970) durchgeführt, die jedoch der kleinen Extraktmenge angepasst werden mußten. Die Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und der lineare Bereich aller biochemischer Bestimmungen wurde mit Hilfe von Reinsubstanzen überprüft.

2.2.2.2. Proteinbestimmung nach O.H.LOWRY (1951)

2.2.2.2.1. Prinzip der Proteinbestimmung

Die Bestimmung wurde in Anlehnung an die Bestimmung von O.H.LOWRY et. al (1951) durchgeführt.

Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Ausbildung eines farbigen Kupferkomplexes, welcher sich aus dem Kupferkation und dem Protein bildet.

2.2.2.2.2. Verwendete Substanzen und Lösungen

1. Lösung A:

   a) 2,7 g/100 ml Kalium-Natriumtartrat x 4 $H_2O$
      (Seignette Salz)

   b) 1,0 g/100 ml Kupfersulfat x 5 $H_2O$

   c) 19,64 g/1000 ml wasserfreies $Na_2CO_3$
      oder 27,04 g/500 ml $Na_2CO_3$ x 10 $H_2O$

Aus diesen Stammlösungen wurde dann die folgende Lösung (Lösung A) zusammengemischt die nur begrenzt haltbar ist und kurz vor Gebrauch jedesmal neu angesetzt wurde.

0,5 ml von a.)
0,5 ml von b.)
49,0 ml von c.)

2. Folinreagenz (Merk) soll 1N sauer sein
   Folin Cicalteus + Aqua Bidest im Verhältnis 1:1 mischen

3. 1N NaOH, gleiche Mengen NaOH und Folinreagenz sollen eine neutrale Lösung ergeben.

4. Serumalbumin 10 mg/10 ml, gelöst in Aqua Bidest

2.2.2.2.3. Aufarbeitung zur Proteinbestimmung

Nach der Aufarbeitung der Herzvorhöfe und der Proteinfällung mit $HClO_4$ wurde der Proteinniederschlag in 2 ml 1N NaOH unter ständigem Rühren gelöst, bis eine klare Lösung vorlag. Hiervon wurden 0,5 ml mit 4,5 ml 1N NaOH verdünnt. Diese 40-fach verdünnte Lösung wurde zur Bestimmung verwendet. Die Messung erfolgte im Spektral-

photometer bei 750 nm in einer 1 cm Küvette gegen einen Leerwert, der alle Bestandteile enthält, die Proteinlösung jedoch wurde gegen Wasser ausgetauscht. Als Kontrolle wurden bei jeder Bestimmung 3 Eichwerte mit Serumalbumin als Standard mitgeführt.

2.2.2.2.4. Ansatz zur Proteinbestimmung

Leerwert: (statt Probe wurde Aqua Bidest verwendet)

(I) 0,5 ml Aqua Bidest
(II) 0,5 ml 1N NaOH
(III) 5,0 ml Lösung A
(IV) 0,5 ml Folin

Standard: (I) 0,5 ml Standardlösung mit bekannter Menge Rinderserumalbumin
(II) 0,5 ml NaOH
(III) 5,0 ml Lösung A
(IV) 0,5 ml Folin

Probe : (I) 0,5 ml Probe (gelöst in 1N NaOH)
(II) 0,5 ml Aqua Bidest (sodaß Endvolumen = 6,5 ml)
(III) 5,0 ml Lösung A
(IV) 0,5 ml Folin

Lösungen (I) und (II) wurden zusammenpipettiert und gut durchgemischt, nacheinander wurde dann in alle Gefäße (Leerwert, Standard und Probe) je 5,0 ml Lösung A zugegeben und sofort auf einem Whartex-Mixer gut durchmischt. Nach 10 Minuten wurde dann in alle Gefäße unter Schütteln

0,5 ml Folin zugegeben. Nach 30 Minuten Wartezeit wurde die Extinktion bei 750 nm gegen den Leerwert gemessen. An Hand der Extinktionsdifferenz (= $\Delta$ E) zwischen Leerwert und der Probe wurde der Proteingehalt errechnet.

2.2.2.2.5. Eichwerte zur Proteinbestimmung

Zur Herstellung der Eichkurve wurden folgende Mengen Serumalbumin (1 mg/ml Aqua Bidest) verwendet. Um das Volumen konstant zu halten wurde mit Aqua Bidest auf 0,5 ml aufgefüllt

| Aqua Bidest | Serumalbumin-Lösung | Proteingehalt |
|---|---|---|
| 480 µl | 20 µl | 20 µg |
| 450 µl | 50 µl | 50 µg |
| 400 µl | 100 µl | 100 µg |
| 350 µl | 150 µl | 150 µg |
| 300 µl | 200 µl | 200 µg |
| 250 µl | 250 µl | 250 µg |
| 200 µl | 300 µl | 300 µg |

2.2.2.2.6. Berechnung des Proteingehalts

Zur Berechnung diente eine Standardkurve, aus der man mit Hilfe der Steigungen den Proteingehalt bestimmen konnte. Da die Standardkurve zwischen den einzelnen Meßpunkten eine unterschiedliche Steigung aufwies, muß die Berechnung des Proteingehalts wie folgt vorgenommen werden:

$$\frac{\text{Extinktion } P_2 - \text{Extinktion } P_1}{\text{Einwaage } E_2 - \text{Einwaage } E_1} = \text{Steigung } (P_1 \longrightarrow P_2)$$

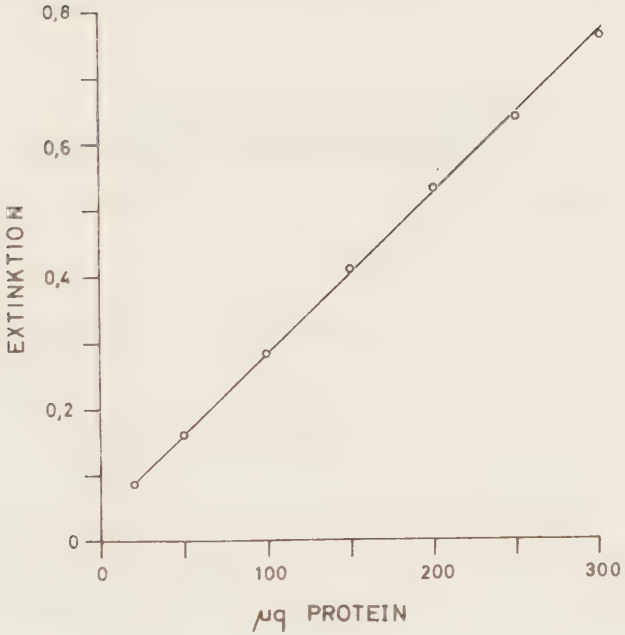



Abb.11: Standardkurve für die Eiweißbestimmung nach LOWRY (1951)

Zur Berechnung des Proteingehalts nimmt man die Steigung zwischen zwei Punkten, in deren Bereich die gemessene Extinktion der Probe liegt.

$$\frac{\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion } P_1}{\text{Steigung } (P_1 \longrightarrow P_2)} = \mu g \text{ Protein zwischen } E_1 \text{ und } E_2$$

Um den gesamten Proteingehalt der Probe zu erhalten, wird zu dem errechneten Wert über $E_1$ die Eichmenge von $E_1$ noch dazu addiert.

2.2.2.3. Creatinphosphat (CP) und ATP-Bestimmung

2.2.2.3.1. Prinzip der Reaktion. (W.LAMPRECHT; I.TRAUTSCHOLD 1970).

(1) CP + ADP $\xrightarrow{CK}$ Creatin (CR) + ATP

(2) ATP + Glucose $\xrightarrow{HK}$ G-6-P + ADP

(3) G-6-P + $NADP^+$ + $H_2O$ $\xrightarrow{G\text{-}6\text{-}P\text{-}D}$ 6-Phosphogluconsäure + NADPH + $H^+$

Die Phosphatübertragung von Creatinphosphat (CP) auf Adenosindiphosphat (ADP) wird durch das Enzym Creatin-Kinase katalysiert. Gebildetes Adenosintriphosphat (ATP) wird mit Hexokinase (HK) und Glucose zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter Rückbildung von ADP umgesetzt. Als Indikatorreaktion dient die NADP-abhängige Oxydation des G-6-P durch Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6-P-D). Pro Mol Creatinphosphat wird 1 Mol NADPH gebildet, Meßgröße ist die bei 334, 340 oder 360 nm gemessene Extinktionszunahme. Die angegebene Reaktionsfolge gestattet neben der Creatinphosphatbestimmung die Messung von G-6-P und ATP im gleichen Testansatz.

In unseren Versuchen wurde die Extinktionsveränderung bei 340 nm in einer 1 cm Halbmikroküvette am Beckmann Spectralphotometer ACTA M VI gemessen, wobei

$E_{340nm} = 1.000 \mathrel{\hat{=}} 0{,}161\ \mu$ Mol/ml NADPH + $H^+$

Zur weiteren Berechnung wurden 750 µl enteiweißter, neutralisierter Überstand zugrunde gelegt wovon 200 µl für die ATP/CP Bestimmung verwendet wurden.

2.2.2.3.2. Verwendete Substanzen und Lösungen.

Triäthanolamin/HCl (Tra.) Puffer 250 mM pH 7.5-7.6

NADP..... 10 mM

Magnesiumchlorid..... 0,1 M

Adenosindiphosphat..... 22 mM

Glukose..... 0,75 M

Glukose-6-phosphatdehydrogenase

1 mg Protein/ml, 140 U/mg Protein

Hexokinase (HK) 2 mg Protein/ml 140 U/mg Protein

Creatinkinase (CK) 10 mg Protein/mg 18 U/mg

Die Enzymsuspensionen der Firma Boehringer Mannheim wurden mit 3,2 M Ammoniumsulfat entsprechend verdünnt. Alle anderen Lösungen wurden mit frischem Aqua Bidest angesetzt.

Glukose und Creatinkinase wurden täglich neu angesetzt, die Creatinkinase (Lyophylisat) wurde in Tra-Puffer pH 9,5 gelöst. NADP- und ADP-Lösungen wurden jede Woche neu angesetzt, alle anderen Lösungen wurden mehrere Wochen verwendet.

2.2.2.3.3. Ansatz zur Bestimmung

(I) Tra-Puffer (pH 7,5 bis 7,6.....500 µl

(II) Probe

(III) $H_2O$ (Aqua Bidest)..... 300 µl

(IV) NADP..... 50 µl

(V) $MgCl_2$..... 50 µl

(VI) ADP..... 10 µl

(VII) Glukose-6-phosphatdehydrogenase 10 µl

(VIII) Glukose..... 50 µl

(IX) Hexokinase..... 10 µl

(X) Creatinkinase..... 10 µl bis 20 µl

Lösungen (I) bis (VII) wurden in einer 1 cm Halbmikroküvette zusammengemischt, bei 340 nm bei 25°C die Grundextinktion ($E_1$) gegen Aqua Bidest gemessen. Hiernach wird innerhalb von 30 Sekunden Glukose und Hexokinase zugegeben und die Extinktionsveränderung für 20 bis 30 Minuten verfolgt ($E_2$). Anschließend wurde 10 bis 20 µl Creatinkinase zugegeben, die Extinktionsveränderung für weitere 20 bis 30 Minuten verfolgt ($E_3$). Da in allen Messungen eine Drift vorhanden ist, muß auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe rückextrapoliert werden, um die Extinktionsveränderung zu bestimmen.

Die Enzymsprünge, d.h. die Eigenextinktion der Enzyme ($\Delta E_{HK}$ und $\Delta E_{CK}$) wurden täglich neu bestimmt und von den jeweiligen Werten abgezogen, sodaß die endgültige Extinktionsveränderung sich wie folgt zusammensetzt:

$$\Delta E_{ATP} = \left\{(E_2 - E_1) - \Delta E_{HK}\right\}$$

und

$$\Delta E_{CP} = \left\{(E_3 - E_2) - \Delta E_{CK}\right\}$$

2.2.2.3.4. Berechnung des ATP- und CP-Gehalts.

Es wird die Menge NADP, die in der Reaktion reduziert wird, aus der gemessenen Extinktionsveränderung ($\Delta$ E) berechnet.

$\Delta$ E = 340 nm = 1,000 $\triangleq$ 161 n Mol/ml

Das Meßvolumen in der Küvette beträgt 1 ml.

Berechnungsbeispiel:

Es wird nach der allgemeinen Formel berechnet

$$\text{n Mol NADPH/Vorhof} = \frac{\Delta E \times 161 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{eingesetztes Probenvolumen}}$$

bei 200 µl Probenvolumen und 750 µl Gesamtvorhofextrakt ergibt sich folgende Formel:

$$\text{n Mol NADPH/Vorhof} = \frac{\Delta E \times 161 \times 750}{1{,}000 \times 200}$$

1 n Mol gebildetes NADPH $\triangleq$ 1 n Mol ATP bzw. 1 n Mol CP. Da es sich hier um energiereiche instabile Metaboliten handelt, konnte das Vorhoffeuchtgewicht nicht bestimmt werden. Der Proteingehalt wurde als Bezugsgröße verwendet, sodaß sich die Formel wie folgt verändert:

$$\text{n Mol ATP (bzw. CP) / mg Protein} = \frac{\Delta E \times 161 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{Eingesetztes Probenvolumen} \times \text{mg Protein}}$$

sodaß im angeführten Zahlenbeispiel sich bei einem Pro-

teingehalt von 3,66 mg/Vorhof folgendes ergibt:

$$\text{n Mol ATP (bzw. CP)/mg Protein} = \frac{\Delta E \times 161 \times 750}{1{,}000 \times 200 \times 3{,}66}$$

2.2.2.4. ADP und AMP Bestimmung.

2.2.2.4.1. Prinzip der Reaktion.

(D.JAWOREK, W.GRUBER, H.U.BERGMEYER, 1970)

(1) $AMP + ATP \xrightleftharpoons{MK} 2\ ADP$

(2) $2ADP + 2PEP \xrightleftharpoons{PK} 2\ ATP + 2\ Pyruvat$

(3) $2Pyruvat + 2NADH + 2H^+ \xrightleftharpoons{LDH} 2\ Laktat + 2\ NAD^+$

Die enzymatische Bestimmung mit Myokinase (MK), Pyruvat-Kinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) erfaßt ADP und AMP in einem Bestimmungssatz. Die NADH - Abnahme, gemessen an der Extinktionsabnahme, ist der AMP und der ADP Menge proportional.

Das Gleichgewicht der Reaktion (3) liegt mit $K \approx 10^4$ l/Mol hinreichend weit rechts um alles Pyruvat zu erfassen. Das Gleichgewicht der Reaktion (2) ($K \approx 2 \times 10^3$ bei $30^oC$) liegt so weit rechts, daß es bereits für sich die mit ca 66% links liegende ADP-Dismutation (1) ausgleichen kann und alles AMP erfaßt wird.

2.2.2.4.2. Verwendete Substanzen und Lösungen.

Triäthanolamin/HCl (Tra-) Puffer 250 mM, pH 7,5 bis 7,6

Phosphoenolpyruvat/$MgSO_4$/KCl

(10,5 mM PEP; 0,375 mM $MgSo_4$; 1,35 mM KCl)

Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (14 mM $\beta$-NADH)

Myokinase (MK) 360 U/mg

Pyruvatkinase (PK) 150 U/mg

Lactatdehydrogenase (LDH) 360 U/mg

Die Enzymstammsuspensionen der Firma Boehringer Mannheim wurden mit 3,2 M Ammoniumsulfatlösung auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt.
Phosphoenolpyruvat / $MgSO_4$ / KCl - Lösung wie auch die NADH - Lösung wurde alle 2 Tage neu angesetzt, alle anderen Lösungen waren bei 4°C haltbar und wurden über mehrere Wochen verwendet.

2.2.2.4.3. Ansatz zur Bestimmung.

(I) Tra-Puffer (pH 7,5 bis 7,6)..... 500 µl

(II) Probe }

(III) Aqua Bidest..}.....ad 360 µl

(IV) PEP..... 100 µl

(V) NADH..... 10 µl

(VI) LDH..... 10 µl

(VII) PK..... 10 µl

(VIII) MK..... 10 µl

Lösungen (I) bis (V) wurden in einer 1 cm Halbmikroküvette zusammenpipetiert, die Extinktion gegen Aqua Bidest bei 340 nm bei 25°C ca. 5 Minuten registriert (= $E_1$). Hiernach wurde 10 µl LDH zum Ansatz hinzugefügt und weitere 15 Minuten die Extinktion registriert (= $E_2$); genauso wurde die Veränderung der Extinktion nach Zugabe von PK

($= E_3$) und MK ($= E_4$) bestimmt.

Täglich wurde ein Leerwert mit allen Reagenzien, aber Wasser statt Probe durchgeführt, um die Extinktionsveränderungen bedingt duch die Enzymzugaben ($\Delta E_{LDH}$, $\Delta E_{PK}$, $\Delta E_{MK}$) zu ermitteln. Diese Änderungen wurden bei der Berechnung von den jeweiligen $\Delta$E-Werten abgezogen, sodaß die endgültigen Extinktionsveränderungen sich wie folgt zusammensetzen:

$$\Delta E_{ADP} = \left\{(E_2 - E_3) - \Delta E_{PK}\right\}$$

und

$$\Delta E_{AMP} = \left\{(E_3 - E_4) - \Delta E_{MK}\right\}$$

In fast allen Messungen wurde eine Drift beobachtet. Die genaue Extinktionsveränderung wurde durch Rückextrapolisierung auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe ermittelt.

2.2.2.4.4. Berechnung des ADP- und AMP-Gehalts.

2.2.2.4.4.1. ADP

Es wird die Menge NADH, die in der Reaktion oxidiert, aus der gemessenen Extinktionsveränderung ($\Delta$E) berechnet.

$$\Delta E_{=340\ nm} = 1{,}000 \triangleq 161 \text{ n Mol/ml}$$

Das Meßvolumen in der Küvette beträgt 1 ml.

Berechnungsbeispiel:

Es wird nach der allgemeinen Formel berechnet

$$\text{n Mol NAD/Vorhof} = \frac{\Delta E \times 161 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{Eingesetztes Probenvolumen}}$$

bei 250 µl Probenvulumen und 750 µl Gesamtvorhofextrakt

ergibt sich folgende Formel:

$$\text{n Mol NAD/Vorhof} = \frac{\Delta E \times 161 \times 750}{1{,}000 \times 250}$$

1 n Mol gebildetes NAD = 1 n Mol ADP

Da es sich hier um energiereiche instabile Metaboliten handelt, konnte das Vorhoffeuchtgewicht nicht bestimmt werden. Der Proteingehalt wurde als Bezugsgröße verwendet, sodaß sich die Formel wie folgt verändert:

$$\text{n Mol ADP/mg Protein} = \frac{\Delta E \times 161 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{eingesetztes Probenvolumen} \times \text{mg Protein}}$$

Im angeführtem Zahlenbeispiel ergibt sich bei einem Proteingehalt von 3,66 mg/Vorhof folgendes:

$$\text{n Mol ADP/mg Protein} = \frac{\Delta E \times 161 \times 750}{1{,}000 \times 250 \times 3{,}66}$$

2.2.2.4.4.2. AMP

Zur Berechnung des AMP-Gehalts im Vorhof kann die gleiche Formel wie zur Berechnung des ADP-Gehalts verwendet werden, jedoch ist zu beachten daß:
1 n Mol NAD $\hat{=}$ 1/2 n Mol AMP, sodaß sich die Formel dann wie folgt verändert:

$$\text{n Mol AMP/mg Protein} = \frac{E \times 161 \times 0{,}5 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{eingesetztes Probenvolumen} \times \text{mg Protein}}$$

2.2.2.5. Creatinbestimmung (CR).

2.2.2.5.1. Prinzip der Reaktion.

(E.BERNT, H.U.BERGMEYER, H.MÖLLERING 1970)

Creatin kann durch ATP und Creatinkinase in Creatinphosphat überführt werden. Die spezifische Reaktion liegt der folgenden Vorschrift für die Messung im Serum zugrunde.

(1) Creatin + ATP $\xrightarrow{CK}$ Creatinphosphat + ADP

(2) ADP + PEP $\xrightarrow[\text{Kinase}]{\text{Pyruvat-}}$ ATP + Pyruvat

(3) Pyruvat + NADH + $H^+$ $\xrightarrow{LDH}$ Lactat + $NAD^+$

Die NADH-Abnahme, gemessen an der Extinktionsveränderung bei 340 nm, ist der Creatinmenge proportional.
Das Gleichgewicht von Reaktion (1) hängt stark vom pH-Wert ab, es liegt im alkalischen Bereich zugunsten von Creatinphosphat. Um das Gleichgewicht der Reaktion auf die rechte Seite zu drängen, muß der pH über 9 liegen und weiterhin bei einem 10fachen Enzymüberschuß gearbeitet werden.

2.2.2.5.2. Verwendete Substanzen und Lösungen.

Triäthanolamin/HCl (Tra-) Puffer pH 9,2

Phosphoenolpyruvat/$MgSO_4$/KCl (10,5 mM PEP; 0,375 mM $MgSO_4$; 1,35 mM KCl)

Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (14 mM ß-NADH)

Adenosintriphosphat 50 mM ATP

Lactatdehydrogenase (LDH) 2,5 mg Protein/ml = 360 U/mg

Pyruvatkinase (PK) 1 mg Protein/ml

Creatinkinase (CK) 10 mg Protein/ml = 18 U/mg

2.2.2.5.3. Ansatz zur Bestimmung.

| | | |
|---|---|---|
| (I) | Puffer pH 9,2 | 500 µl |
| (II) | Probe | |
| (III) | Aqua Bidest. | ad 250 µl |
| (IV) | PEP | 100 µl |
| (V) | NADH | 10 µl |
| (VI) | ATP | 20 µl |
| (VII) | LDH | 10 µl |
| (VIII) | PK | 10 µl |
| (IX) | CK | 10 µl |

Lösungen (I) bis (VIII) wurden in 1 cm Halbmikroküvetten zusammengemischt und die Extinktion am Beckmann Spektralphotometer ACTA M VI bis zu Konstanz gegen Aqua Bidest gemessen (ca 10 bis 15 Minuten = $E_1$). Hiernach wird 100 µl Creatinkinase hinzugegeben und die Extinktionsveränderung für 30 bis 40 Minuten registriert (= $E_2$). Falls keine Konstanz der Extinktion erreicht wird, muß auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe rückextrapoliert werden um die Extinktionsveränderung zu ermitteln ($E_1$-$E_2$). Die Extinktionsveränderung bedingt durch die Enzymzugabe wurde täglich neu ermittelt = $\Delta E_{CK}$. Dieser Wert (Enzymsprung) muß bei der Berechnung berücksichtigt werden, sodaß die Extinktionsveränderung sich dann wie folgt zusammensetzt:

$$E_{Creatin} = \left\{(E_1 - E_2) - \Delta E_{CK}\right\}$$

Lösungen (IV), (V) und (VI) wurden aus Gründen der Haltbarkeit alle 2 Tage neu angesetzt. Alle anderen Lösungen waren länger haltbar. Die Enzymsuspensionen der Firma

Boehringer Mannheim wurden mit 3,2 M Ammoniumsulfat auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt.

2.2.2.5.4. Berechnung des Creatingehalts (CR).

Es wird die Menge NADH, die in der Reaktion oxidiert wird, aus der gemessenen Extinktionsveränderung ($\Delta E$) berechnet.

$$\Delta E_{340\ nm} = 1{,}000 \mathrel{\hat{=}} 161 \text{ n Mol/ml}$$

Das Meßvolumen in der Küvette beträgt 1 ml.

Berechnungsbeispiel:

Es wird nach der allgemeinen Formel berechnet

$$\text{n Mol NAD/Vorhof} = \frac{\Delta E \times 161 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{eingesetztes Probenvolumen}}$$

bei 150 µl Probenvolumen und 750 µl Gesamtvorhofextrakt ergibt sich folgende Formel:

$$\text{n Mol NAD/Vorhof} = \frac{\Delta E \times 161 \times 750}{1{,}000 \times 150}$$

1n Mol gebildetes NAD $\mathrel{\hat{=}}$ 1 n Mol CR

Da es sich hier um energiereiche instabile Metaboliten handelt, konnte das Vorhoffeuchtgewicht nicht bestimmt werden. Der Proteingehalt wurde als Bezugsgröße verwendet, sodaß sich die Formel wie folgt verändert:

$$\text{n Mol CR/mg Protein} = \frac{\Delta E \times 161 \times \text{Volumen Gesamtvorhofextrakt}}{1{,}000 \times \text{eingesetztes Probenvolumen} \times \text{mg Protein}}$$

Im angeführten Zahlenbeispiel ergibt sich bei einem Proteingehalt von 3,66 mg/Vorhof folgendes:

$$\text{n Mol CR/mg Protein} = \frac{\Delta E \times 161 \times 750}{1{,}000 \times 150 \times 3{,}66}$$

2.2.2.6. Laktatbestimmung.

Unter Anoxie ist die anaerobe Glykolyse der einzige Energiespender. Das dabei gebildete Laktat häuft sich an und kann unter diesen Bedingungen nicht weiter metabolisiert werden. Vorversuche haben ergeben, daß das gebildete Laktat das Vorhofgewebe schnell verläßt und sich im Nährmedium anhäuft. Zu bestimmten Zeitintervallen wurden daher Proben von je 500 µl dem Nährmedium entnommen und der Laktatgehalt untersucht.

Aus Laktatkonzentration und Badvolumen werden, unter Korrektur von entnommener und zugesetzter Flüssigkeitsmenge, die vom Vorhof gebildete Laktatmenge über die verschiedenen Zeitintervalle berechnet.

2.2.2.6.1. Prinzip der Reaktion.

$$\text{Laktat} + NAD^+ \xrightarrow{LDH} \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der linken Seite, (Gleichgewichtskonstante $K = 2{,}9 \times 10^{-12}$ Mol/l bei 25°C), sodaß zur quantitativen Dehydrierung von L-Laktat die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden müssen. Protonen werden durch ein alkalisches Reaktionsmedium gebunden, Pyruvat wird als Hydrazon abgefangen. Die bei dem optischen Test für L-Laktat zugrunde liegende Gleichung lautet demnach:

$$\text{L-Lactat} + NAD^+ + \text{Hydrazin} \xrightarrow[\text{pH } 9{,}6]{LDH} \text{Pyruvat-hydrazon} + NADH + H_3O^+$$

Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion beträgt bei

25°C und pH = 9,5 $K_c$ = $7x10^2$ Mol/l. Für eine quantitative und hinreichend schnelle Reaktion sind relativ hohe Konzentrationen an NAD und LDH erforderlich.

2.2.2.6.2. Verwendete Substanzen und Lösungen zur Laktatbestimmung.

(I) Glycin 1 M

(II) Hydrazinsulfat 0,4 M

(III) Äthylendiamintetraacetat (ÄDTA-$Na_2H_2x2H_2O$, 6 mM)

(IV) Nicotinadenindinucleotid, NAD als freie Säure (60 mM)

(V) Lactatdehydrogenase, LDH aus Skelettmuskel 360 U/mg

LDH der Firma Boehringer Mannheim wurde mit 3,2 M Ammoniumsulfat 1:1 verdünnt, alle anderen Lösungen wurden mit Aqua Bidest angesetzt. Der ÄDTA enthaltende Glycin-Hydrazinpuffer wurde mit 2N NaOH am pH-Meter auf 9,5 eingestellt und war in dieser Form nur eine Woche haltbar.

2.2.2.6.3. Ansatz zur Laktatbestimmung.

(I) Glycin-Hydrazinsulfatpuffer..... 500 µl

(II) Probe

(III) Aqua Bidest.....ad 430 µl

(IV) NAD..... 50 µl

(V) LDH..... 20 µl

Die Messungen wurden bei 340 nm in einer temperierten Küvettenhalterung bei 25°C durchgeführt. Lösungen (I) bis (III) wurden zusammen gemischt und im Beckmann Spektralphotometer ACTA M VI ca 2 Minuten belassen, sodaß eine

Temperatur von 25°C erreicht wurde. Eine Vergleichsküvette, die bis auf die Probe die gleichen Bestandteile wie die Versuchsküvette enthält, muß bei jeder Messung neu bereitet werden. NAD wurde im Spektralphotometer in beide Küvetten zugegeben, kurz durchmischt und die Extinktion für 3 Minuten gemessen (=Basisextinktion $E_1$). Hiernach wurde LDH im Spektrophotometer in beide Küvetten zugegeben und die Extinktionsänderung für weitere 20 Minuten registriert ($E_2$). Steigt $E_2$ nach 20 Minuten weiter an, während die Anfangsextinktion $E_1$ konstant war, ist als wahrscheinlichster Störfaktor die Aktivität der LDH zu gering. Da NAD mit Hydrazin einen Komplex bildet, der bei 340 nm absorbiert, und dessen Ausbildung zeitabhängig ist, muß NAD möglichst gleichzeitig in beide Küvetten gegeben werden. Der Zeitabstand bis zur Zugabe von LDH, welches möglichst gleichzeitig in beide Küvetten zugefügt werden sollte, muß immer konstant sein (in unserem Fall 3 Minuten), da LDH mit dem NAD-Hydrazinkomplex zu einer Verbindung reagiert, die bei dieser Wellenlänge stärker absorbiert als der NAD-Hydrazinkomplex. Bei genauer Beachtung dieser Versuchsbedingungen bildet sich der Komplex in der Proben- wie auch in der Kontrollküvette gleichermaßen aus und stört die Messung nicht.

Die Extinktionsveränderung $\triangle E$ entspricht der gebildeten Menge NADH + $H^+$. Aus diesem Wert kann dann die Laktatmenge in der Probe berechnet werden:

$$\triangle E = E_2 - E_1$$

2.2.2.6.4. Berechnung des Laktatgehalts aus dem Nährmedium

Aus den gemessenen Extinktionsveränderungen $\Delta E$ wird die Menge von NAD, die in der Reaktion zu NADH + $H^+$ reduziert wird, berechnet. Da die Reaktion stöchometrisch verläuft, entspricht:

u µM NAD reduziert = 1 µM Laktat gebildet.

Das Meßvolumen in der 1 cm Küvette beträgt 1 ml. Das Probenvolumen wurde so dimensioniert, daß $\Delta E$ nicht größer als 0,5 wurde.

1. $\Delta E_{\lambda=340\ nm} = 1{,}0000 = 161$ n Mol/ml
   Laktatproduktion = L

2. $L = \frac{\Delta E \times 161}{1{,}0000}$ n Mol/ml Meßvolumen

3. $= \frac{\Delta E \times 161}{1{,}0000 \times PV}$ n Mol/µl Probenvolumen

4. $= \frac{\Delta E \times 161 \times 500}{1{,}000 \times PV}$ n Mol/500 µl

5. $= \frac{\Delta E \times 161 \times 500 \times F}{1{,}000 \times PV}$ n Mol Gesamtlaktat

Bei der zweiten Probe muß das bereits entnommene Laktat aus der ersten Probe (Ergebnisse Gleichung 4.) kompensiert werden, sodaß:

6. $L_{Probe\ 2} = \left[\left(\frac{\Delta E_{Probe\ 1} \times 161 \times 500}{1{,}000 \times PV}\right) + \left(\frac{\Delta E_{Probe\ 2} \times 161 \times 500 \times F}{1{,}000 \times PV}\right)\right]$

Bei der dritten Probe muß zu dem Ergebnis aus Gleichung 5. (Laktatproduktion $_{Probe\ 3}$) noch die Laktatmenge / 500 µl von Probe 1 und Probe 2 (Ergebnisse jeweils Gleichung 4.) addiert werden. Auf die gleiche Weise wird bei den wei-

teren Proben verfahren.

Zeichenerklärung der Ableitung:

E = Extinktionsveränderung

L = Laktatproduktion (n Mol)

PV = eingesetztes Probenvolumen zur Bestimmung (µl)

500 = Volumen der entnommenen Probe = 500 µl

Faktoren des verbleibenden Badvolumens bei einer 8 ml Versuchskammer:

| | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 | Probe 4 |
|---|---|---|---|---|
| Badvolumen | 8,0 ml | 7,5 ml | 7,0 ml | 6,5 ml |
| Faktor | 16 | 15 | 14 | 13 |

Beispiel eines Versuches:

Probe 3 wurde nach 2 Stunden Versuchsdauer (= Meßpunkt 3) entnommen.

Extinktion = 0,25; PV = 100 µl; Volumen der Versuchskammer = 8 ml

Aus Gleichung 5.

$$L_{\text{Probe 3}} = \frac{E_{\text{Probe 3}} \times 161 \times 500 \times F}{1{,}0000 \times PV}$$

$$= \frac{0{,}25 \times 161 \times 500 \times 14}{1{,}0000 \times 100}$$

$$= 2817{,}50 \text{ n Mol Laktat}$$

Vorher wurden in Probe 1: 500 µl Nährlösung mit 6,9 n Mol Laktat und in Probe 2: 500 µl Nährlösung mit 80,5 n Mol

Laktat entnommen (Ergebnisse jeweils Gleichung 4).

Korrigierter Laktatgehalt zum Zeitpunkt der Entnahme der Probe 3:

= 2817,50 + 6,9 + 80,5 n Mol

= 2904,65 n Mol

= 2,91 µ Mol.

2.3. Sauerstoffverbrauchsmessungen.

Die Messung des Sauerstoffverbrauches ruhender und elektrisch gereizter Herzvorhöfe wurde mit einer bereits früher eingehend beschriebenen Apparatur (M.SIESS et al. 1962), die nach H.J.MENSING (1974) verbessert worden war, durchgeführt. Für die anaerobe Energiebilanz wurden Bestimmungen des Sauerstoffverbrauches durchgeführt, bei gleichzeitiger Registrierung der Kontraktionsarbeit linker Herzvorhöfe bei 35°C. Diese im einzelnen sehr diffizilen und zeitraubenden Untersuchungen wurden von Herrn K.STIELER (Biotechniker, Pharmakologisches Institut, Universität Tübingen) durchgeführt, dem ich dafür zu großem Dank verpflichtet bin.

2.3.1. Berechnung des Nutzeffektes.
(H.J.KELLER 1970)

Der Nutzeffekt ist definiert als der Quotient aus Leistung und der durch Verbrennung pro Zeiteinheit gewonnenen Energie. Bei der oxydativen Phosphorylierung werden

theoretisch pro Mol Sauerstoff 6 Mol ATP gewonnen. Wenn bei der Hydrolyse von 1 Mol ATP zu ADP 7 kcal frei werden, wird bei der Verbrennung von 1 Mol Sauerstoff ein Energiegewinn von 42 kcal erzielt. Durch Einsetzen des mechanischen Wärmequivalents ergibt sich für ein µ Mol Sauerstoff ein Energiegewinn von 1793,4 cm x p. Der Nutzeffekt wurde bestimmt nach der Formel:

$$\eta = \frac{\text{Kontraktionsleistun } (A_h) \text{ cm x p/h}}{O_2\text{-Verbrauch } \mu \text{ Mol/h x 1793,4 cm x p/}\mu \text{ Mol } O_2}$$

Bei der Berechnung des "Bruttonutzeffektes" wurde der Gesamtsauerstoffverbrauch der Berechnung zugrunde gelegt, bei der Berechnung des "Nettonutzeffektes" wurde der Gesamtsauerstoffverbrauch - Ruhesauerstoffverbrauch in der oben genannten Formel verwendet.

## 2.4. Statistik

Die Signifikanzwerte wurden mit dem gepaarten bzw. Gruppen-T-Test berechnet.

Als Streuungen wurden die mittleren Fehler der Mittelwerte angegeben ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Funktionelle Messungen

### 3.1.1. Untersuchungen bei Normoxie

#### 3.1.1.1. Kraft-Frequenzbeziehungen bei elektrisch gereizten linken Herzvorhöfen bei verschiedenen Temperaturen.

An linken, elektrisch gereizten Meerschweinchenherzvorhöfen wurde die Kontraktionskraft und die Anoxietoleranz (d.h. die Zeit bis zum Erliegen der Kontraktionskraft unter Anoxie) bei verschiedenen Frequenzen und Temperaturen untersucht. Wir wählten einen Frequenzbereich von 0,5 bis 2,5 Hz mit Frequenzintervallen von 0,5 Hz bei Temperaturen von 25°C, 30°C und 35°C. Die verschiedenen Temperaturen wurden in 3 Versuchsgruppen aufgeteilt, innerhalb jeder Gruppe wurden die verschiedenen Frequenzen randomisiert, sodaß jede Frequenz zu jedem Zeitpunkt des Versuches untersucht wurde, um den Einfluß der Versuchsdauer so gering wie möglich zu halten. Diese Versuchsanordnung erklärt auch die große Streubreite der Einzelwerte bei den Meßpunkten, da die Kontraktilität des Vorhofes im Laufe des Versuches abnimmt (vgl. Abb 15, 16 und 17). Nachdem sich die Kontraktilität bei einer bestimmten Frequenz unter aeroben Bedingungen auf ein Gleichgewicht eingestellt hatte wurde auf anaerobe Bedingungen umgeschaltet und die Zeit dann bis zum Erlöschen der Kontraktionsarbeit als Maß der Anoxietoleranz bei der entsprechenden Frequenz bestimmt (siehe Kapitel 3,1.2.1.).

In Abb. 12 ist deutlich zu ersehen, daß die Kraft-Frequenzbeziehung der Präparate bei Frequenzen von 0,5 bis 2,5 Hz und den verschiedenen Temperaturen unter aeroben Bedingungen unterschiedliches Verhalten zeigen.
Bei 25°C ist die Kontraktionskraft und die Zunahme der Kraft bei einer Frequenz von 2,5 Hz am größten, bei 30°C verläuft die Kurve von einem niedrigeren Ausgangswert fast paralell zu einem niedrigeren Maximum bei 1,75 Hz, bei 35°C steigt die Kontraktionskraft erst ab einer Frequenz von 1 Hz, um ein Maximum zwischen 2,0 Hz und 2,5 Hz zu erreichen. Bei 35°C und einer Schlagfrequenz von 0,5 Hz ist ein Wendepunkt erreicht, bei kleineren Frequenzen steigt die Kontraktionskraft wieder an. Dieses stimmt mit den Ergebnissen von V.KRUTA (1938) überein.

Da die physiologische Temperatur des Meerschweinchens 38,5°C ist, wurde auch bei dieser Temperatur die Kraft-Frequenzbeziehung untersucht. Im Vergleich zu den Werten bei 35°C liegt die Kontraktionskraft bei 38,5°C und einer Frequenz von 0,5 Hz höher. Steigende Schlagfolge verursacht eine weitere Erhöhung der Kontraktionskraft, ein Maximum ist bei 5 Hz erreicht (in Abb. 13 als 100% angegeben). Mit einer Dosis von $1x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin bei 5 Hz konnte die Kontraktionskraft noch von 100% auf 150% gesteigert werden, Erhöhung der g-Strophanthindosis auf $2x10^{-7}$ g/ml Endkonzentration verursachte eine Steigerung der Kontraktionskraft auf 204%. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Kontraktilität bei einer Schlagfolge von 5 Hz nicht einen Maximalwert darstellt, somit

eine weitere Steigerung mit Pharmaka durchaus möglich ist.

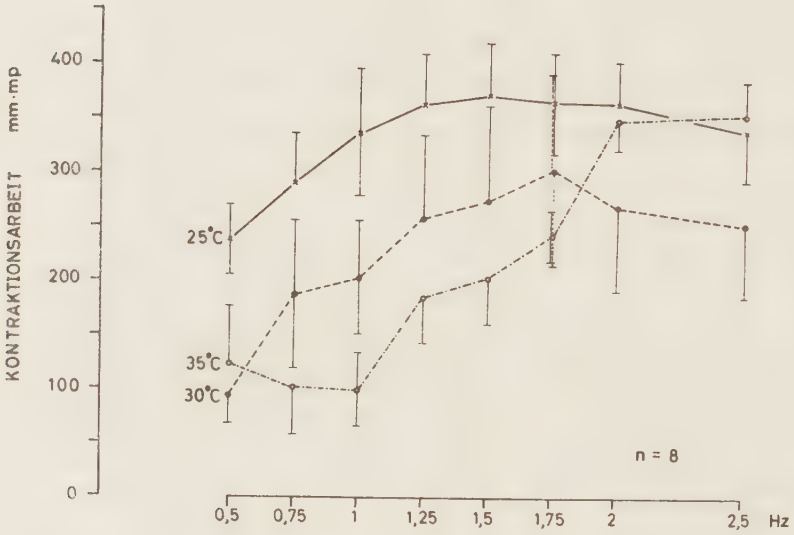



Abb.: 12 Kraft-Frequenzbeziehung bei verschiedenen Temperaturen unter Normoxie an elektrisch gereizten linken Meerschweinchenherzvorhöfen

3.1.1.2. Vergleich der Kontraktionsarbeit bei gleichbleibender Frequenz von 0,5 Hz bei verschiedenen Temperaturen.

Bei gleichbleibender Frequenz von 0,5 Hz ist die Kontraktionsarbeit / Schlag bei 38,5°C, der Körpertemperatur des Meerschweinchens, am größten. Die kleinste Kontraktionsarbeit fanden wir bei 30°C, die sich von der bei 35°C allerdings nicht signifikant unterscheidet. Bei 25°C da-

gegen beobachteten wir wieder eine Kontraktionsarbeit, die vergleichbar ist mit der bei 38,5°C; dieses ist wahrscheinlich auf die Kälteinotropie zurückzuführen. (Abb.14).

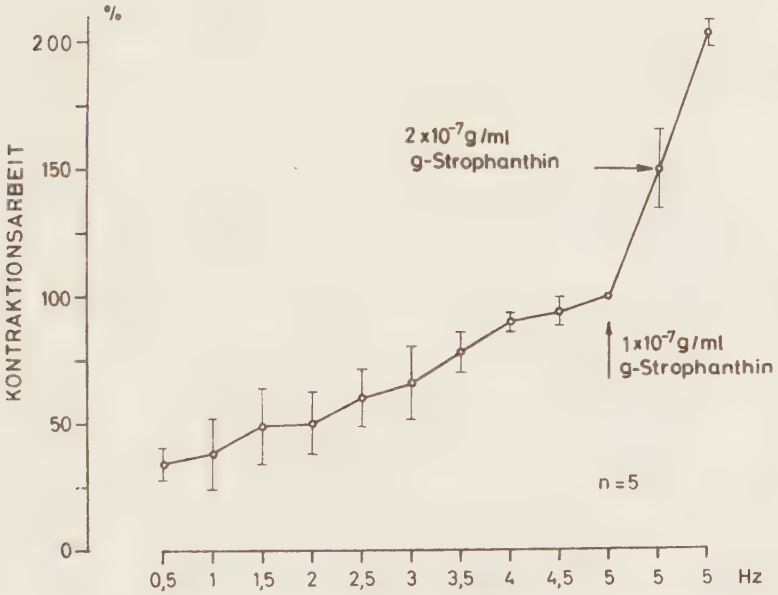



Abb.13: Untersuchungen zur Kontraktilität unter Normoxie bei steigender Frequenz und Stimulation mit g-Strophanthin bei 38,5°C. Meßpunkte beim Maximum der Kontraktionskraft nach Frequenzerhöhung bei Intervallen von jeweils 30 Minuten.

Auch der höchste beobachtete Wert bei 38,5°C und einer Frequenz von 0,5 Hz beträgt nur 35% der maximalen Kontraktionskraft, die in unseren Versuchen bei einer Reizfrequenz von 5 Hz erreicht wurde.

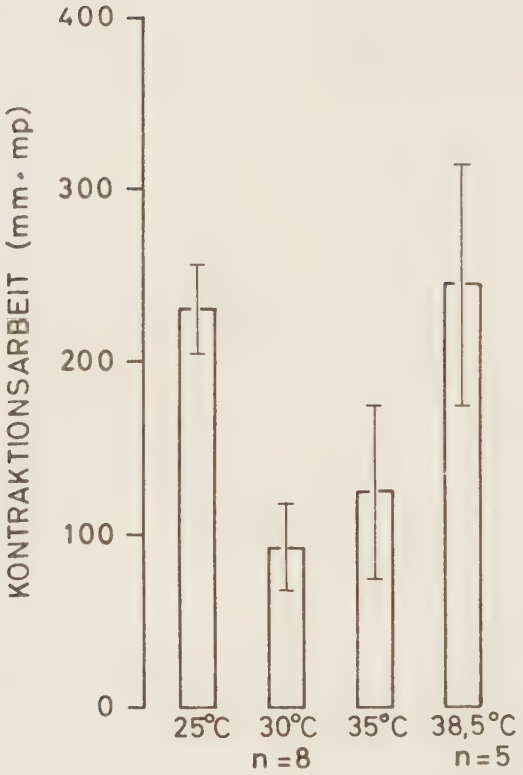



Abb.14: Kontraktionsarbeit/Schlag ($A_s$) bei gleichbleibender Frequenz von 0,5 Hz bei verschiedenen Temperaturen. Zusammenstellung der Werte der 3 randomisierten Gruppen 25°C, 30°C und 35°C aus Abbildung 12 verglichen mit der Gruppe 38,5°C aus Abbildung 13. (Absolutwerte in mm x mp).

3.1.1.3. Ermüdung der Kontraktionskraft bei Normoxie in Abhängigkeit von der Zeit.

3.1.1.3.1. Versuchstemperatur 38,5°C.

Aus den Ergebnissen von Abbildung 12 zeigte sich, daß in Abhängigkeit von der Frequenz zwischen 0,5 Hz und 5 Hz ein ausgeprägter Anstieg der Kontraktionsarbeit/Schlag erfolgte. Die Werte waren jeweils auf dem Maximum gemessen, welches wenige Minuten nach Erhöhung der Frequenz auf den nächst höheren Wert erreicht wurde. Innerhalb des 30 Minuten-Intervalles vor dem Umschalten auf die nächst höhere Frequenz hatte sich gezeigt, daß von diesem erreichten Maximum aus, in Abhängigkeit von der Frequenz, ein verschieden starker Abfall der Kontraktionskraft ("Ermüdung") erfolgte. In weiterführenden Untersuchungen wurde deshalb die Abnahme der Kontraktionskraft über die Zeit in 3 getrennten Versuchsgruppen mit den Frequenzen 0,5 Hz, 1,5 Hz und 5 Hz überprüft.

Aus Abbildung 15 und 16 wird deutlich, daß sich der Abfall der Kontraktionskraft ("Ermüdung") innerhalb der ersten 3 bis 4 Stunden bei einer Frequenz von 0,5 und 1,5 Hz in keiner Weise voneinander unterscheidet. Die "Ermüdung" bei einer Schlagfolge von 5 Hz ist dabei nicht so stark wie bei den anderen beiden Frequenzen die untersucht wurden. Bei den Frequenzen von 0,5 Hz und 1,5 Hz sinkt die Kontraktionskraft innerhalb von 3 bis 4 Stunden auf ca 10% des Ausgangswertes ab, dagegen wird bei einer Frequenz von 5 Hz nach 3 bis 4 Stunden ein Niveau erreicht,

das mit 45% des Ausgangswertes hochsignifikant über dem Ermüdungseffekt der beiden anderen Frequenzen liegt. Diese Kontraktionskraft von 45% des Ausgangswertes kann dann über mehrere Stunden aufrecht erhalten werden.

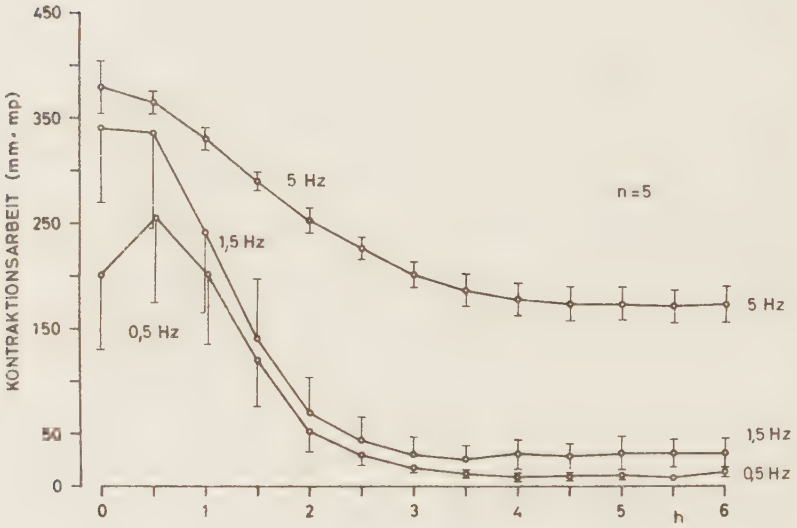



Abb.15: Abfall der Kontraktionskraft (Ermüdung) elektrisch gereizter linker Herzvorhöfe bei Schlagfrequenzen von 0,5; 1,5 und 5 Hz unter Normoxie bei 38,5°C. Veränderung der Absolutwerte in Abhängigkeit von der Zeit. (Werte in mm x mp).

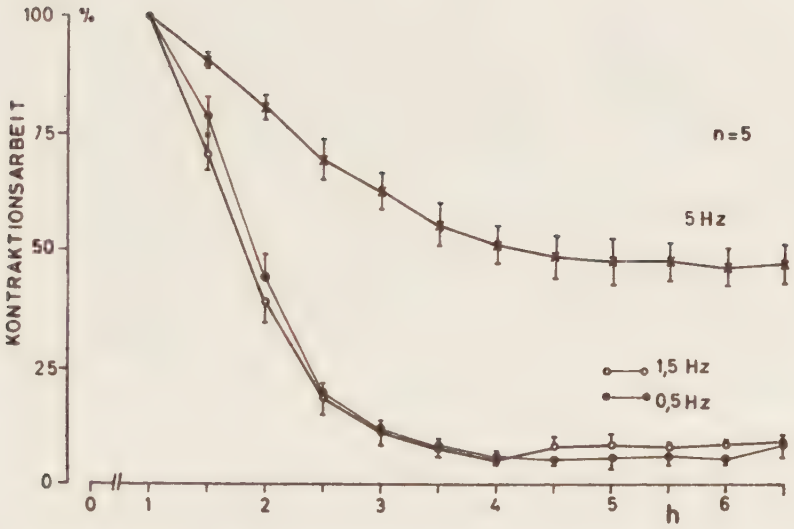



Abb.16: Abfall der Kontraktionskraft (Ermüdung) elektrisch gereizter linker Herzvorhöfe bei Schlagfrequenzen von 0,5; 1,5 und 5,0 Hz unter Nomoxie bei 38°C. Prozentuale Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit.

3.1.1.3.2. Versuchstemperatur 35°C

3.1.1.3.2.1. Elektrisch gereizten linken Herzvorhöfen bei 0,5 Hz.

Um den "Ermüdungseffekt" bei 35°C und einer Frequenz von 0,5 Hz zu bestimmen, wurde die Kontraktionskraft linker elektrisch gereizter Herzvorhöfe unter Normoxie (d.h. Begasung mit 95% $O_2$/5% $CO_2$) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Wie bereits in Abbildung 12 deutlich wird, beträgt entsprechend der Kraft-Frequenz-Beziehung die geleistete Kontraktionsarbeit pro Schlag bei 0,5 Hz und 35°C nur

ca. 35% des bei einer Frequenz von 2,0 bis 2,5 Hz erreichbaren Maximalwertes. In allen folgenden Versuchen wurde diese verringerte Kontraktionskraft (35% der Maximalkontraktionskraft) als Ausgangskontraktionskraft bewertet und als Basis für weiter Untersuchungen und Berechnungen mit 100% zugrunde gelegt. Da die späteren Untersuchungen unter Anoxie meist über mehrere Stunden verliefen, war es weiterhin erforderlich, die Kontraktionskraft unter Normoxie, über einen der Anoxie entsprechenden Zeitraum, zu bestimmen.

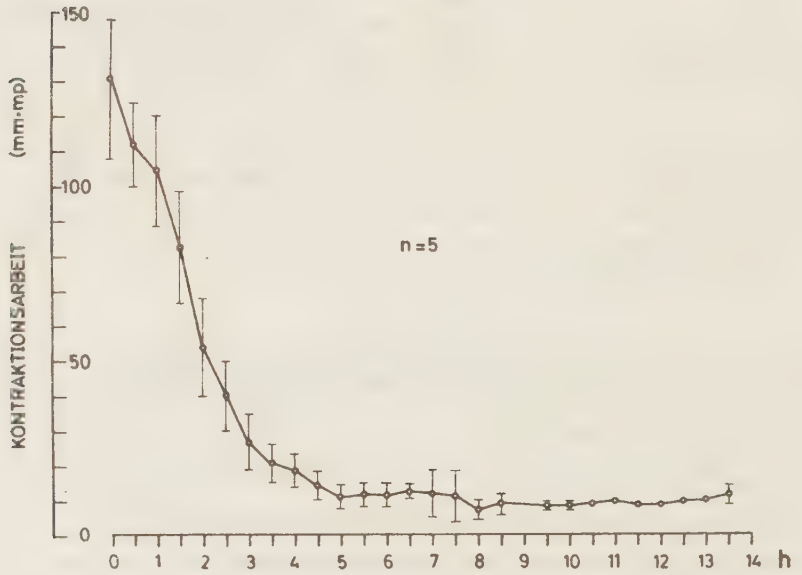



Abb.17: Abfall der Kontraktionskraft (Ermüdung) isolierter linker elektrisch gereizter Herzvorhöfe bei 0,5 Hz unter Normoxie bei 35°C in Abhängigkeit von der Zeit.

In Abbildung 17 wird deutlich, daß die Kontraktionskraft während des Versuchsablaufes ähnlich wie bei 38,5°C und besonders in den ersten 4 Stunden, sehr stark abnimmt auf Werte von ca. 15% des Ausgangswertes. Dieser Wert ist dann für mehrere Stunden relativ stabil. Im Vergleich zu den Versuchen in Abbildung 15 wurde die erste Bestimmung erst eine Stunde nach der Vorbereitung (d.h. zum Zeitpunkt 1) durchgeführt. Infolge der vorrübergehenden Verbesserung der Kontraktionskraft (siehe Abbildung 15) ist zwischen ZP 0 und ZP 1 kein signifikanter Unterschied festzustellen.

3.1.1.3.2.2. Spontanschlagende Herzvorhöfe mit intaktem Sinusknoten.

Sowohl bei 38,5 als auch bei 35°C und sehr niedrigen Frequenzen setzt die "Ermüdung" in viel stärkerem Maße ein als bei einer der Temperatur entsprechenden physiologischen Frequenz des Schrittmachers. Deshalb wurde an spontanschlagenden Herzvorhöfen (linke und rechte zusammenhängende Vorhöfe) in Abhängigkeit von der Zeit das Verhalten der Frequenz und der Kontraktionsarbeit/Schlag sowie der sich daraus ergebenden Gesamtarbeit/Stunde untersucht (Abb.18).

Frequenzveränderungen: bei 35°C fanden wir eine mittlere Schrittmacherfrequenz von 206 Schlägen/Minute (=100% in der Zeichnung), die innerhalb der folgenden ein bis zwei Stunden des Versuches auf 188 Schläge/Minute (=94,03%) zurückgeht, um dann während der folgenden 5 Stunden wieder auf 220 Schläge/Minute anzusteigen (=105,81%).

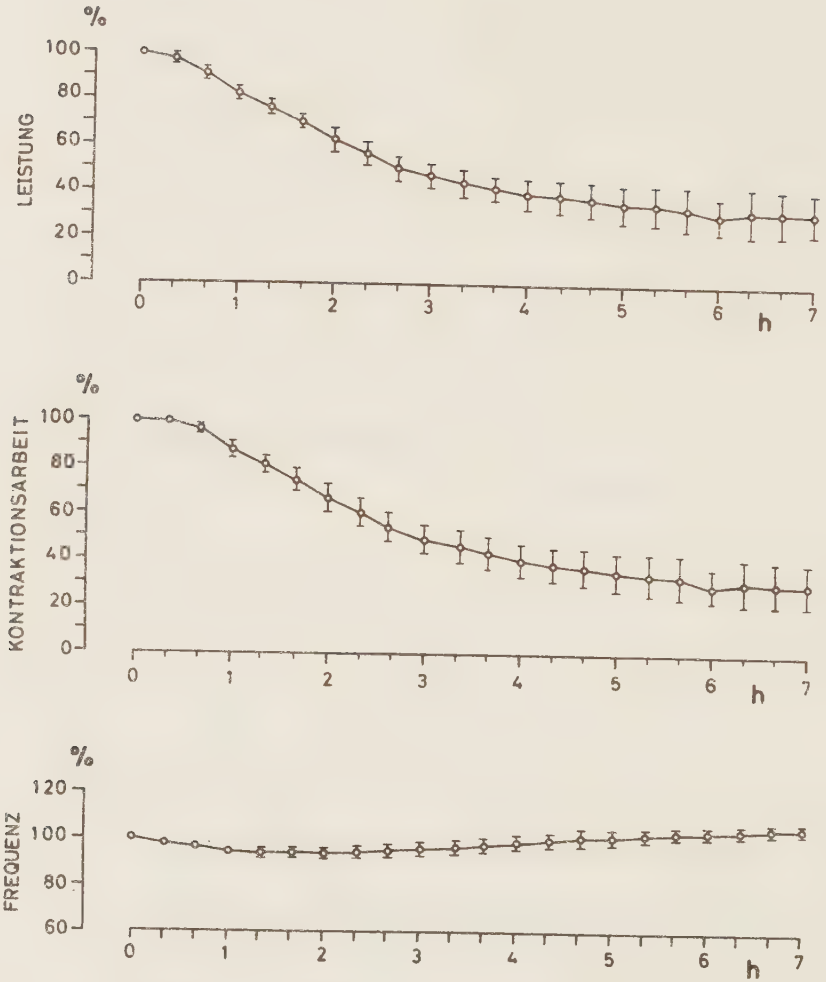



Abb.18: Abfall der Kontraktionskraft (Ermüdung) und das Verhalten der Frequenz spontanschlagender Herzvorhöfe unter Normoxie bei 35°C.

Veränderungen der Kontraktionsarbeit/Schlag ($A_s$):
Auch an spontanschlagenden Präparaten fanden wir in den ersten 3 bis 4 Stunden einen Abfall der Kontraktionsarbeit/Schlag von 400 mm x mp auf 160 mm xmp (d.h. also auf 40% des Ausgangswertes). Ab der vierten bis zur siebten Stunde war der Abfall wesentlich geringer, sodaß nach einer Versuchsdauer von sieben Stunden ein Wert von 110 mm x mp (= 30% des Ausgangswertes) erreicht wurde. Damit ergibt sich auch hier, vergleichbar mit den Befunden bei einer Versuchstemperatur von 38,5°C, daß der "Ermüdungseffekt" bei hohen Frequenzen weniger ausgeprägt ist im Vergleich zu niedrigen Frequenzen bei der gleichen Versuchstemperatur.

Veränderungen der Leistung ($A_h$):
Da die Leistung ein Produkt aus Frequenz und geleisteter Arbeit ($A_s$) ist, ist der Abfall im Laufe des Versuches nicht so stark, da hier die leichte Steigerung der Frequenz mit in die Berechnung eingeht.

3.1.2. Untersuchungen bei akuter Anoxie.

3.1.2.1. Die Zeit bis zum Erlöschen der Kontraktionskraft elektrisch gereizter linker Herzvorhöfe nach akuter Anoxie (Anoxietoleranz) in Abhängigkeit von Frequenz und Temperatur.

Wie bereits in 3.1.1.1. beschrieben ist, wurde die Kraft-Frequenzbeziehung bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C und 35°C) und Frequenzen untersucht. Nachdem die Kon-

traktionskraft, bei der durch die Randomisierung bestimmten Frequenz, ein Gleichgewicht erreicht hatte, wurde durch Umschalten der Begasung auf 95% $N_2$/5% $CO_2$ eine akute Anoxie herbeigeführt, und die Zeitdauer bis zum Erlöschen der messbaren Kontraktionskraft (ANOXIETOLERANZ) bestimmt. Danach wurde jeweils für eine Stunde auf 95% $O_2$/ 5% $CO_2$ umgeschaltet, wobei gleichzeitig der Randomisierung entsprechend die folgende Frequenz gewählt wurde. Auf diese Weise wurden über 12 Stunden die in Abbildung 12 + 19 gezeigten Werte gewonnen. Daß trotz der langen Versuchsdauer von 12 Stunden und der damit bedingten Ermüdung, die alle Frequenzbereiche gleichermaßen betrifft, gut vergleichbare Werte gewonnen wurden, zeigen die Normalwerte bei 0,5 Hz und 35°C. Verglichen mit anderen Serien in Abb. 14 und 17 liegen hier die Werte im Mittel von 130 mm x mp im gleichen Bereich, obwohl diese Werte bereits nach einer Stunde Versuchsdauer gewonnen wurden. Bei 30°C und einer Frequenz zwischen 0,5 Hz bis 1,5 Hz betrug die Anoxietoleranz ca. 16,7 Minuten und sinkt bei höheren Frequenzen bis auf 5,4 Minuten ab. Bei 25°C ist bei 0,5 Hz die mittlere Anoxietoleranz auf 34,7 Minuten erhöht und sinkt dann mit zunehmender Frequenz kontinuierlich ab, um dann bei einer Frequenz von 2,5 Hz ähnliche Werte zu erreichen wie bei 30°C.

Bei 35°C ist die Anoxietoleranz gegenüber 30°C und 25°C beträchtlich verlängert und erreicht im Mittel Werte von 51,4 Minuten bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Zunehmende Schlagfolge bei 35°C bedingt wie zu erwarten, eine Ver-

kürzung der Anoxietoleranz. Diese liegt aber über den Werten von 30°C oder 25°C. Damit erscheint außer der Kontraktionsleistung ein temperaturbedingter Anstieg der anaeroben Glykolyse für die Verlängerung der Anoxietoleranz ausschlaggebend. Dabei erscheint es wichtig, daß die Gesamtleistung bei einer Frequenz von 0,5 Hz zwischen 30°C und 35°C nicht signifikant differiert, während die von 25°C und 38,5°C über beiden liegt (siehe Abb. 14). Versuche zur Bestimmung der Anoxietoleranz bei 38,5°C und einer Frequenz von 0,5 Hz ergaben keine Verlängerung der Anoxietoleranz, sodaß für die weiteren Versuche eine Schlagfrequenz von 0,5 Hz und eine Temperatur von 35°C festgelegt wurde. Die nachfolgenden Untersuchungen liegen im Bereich der hier gefunden Anoxietoleranz und im Bereich der kleinsten geleisteten Arbeit pro Schlag.
Zur Bestimmung der Anoxietoleranz bei 35°C und 0,5 Hz wurde entsprechend dem folgenden Kapitel (3.1.2.2.) nach einer Stunde von Normoxie auf Anoxie umgestellt. Ein Gleichgewicht der normoxischen Kontraktionskraft hatte sich bis zu diesem Zeitpunkt eingestellt. Die Anoxietoleranz verlängerte sich in insgesamt 6 Versuchen auf 6,6 $\pm$ 1,55 Stunden(Abb.22). Diese scheinbare Diskrepanz zu dem oben genannten Wert von 51,4 Minuten ist darauf zurückzuführen, daß hier, im Unterschied zu Abb.19, keine verschiedenen Frequenzbereiche am Herzvorhof geprüft wurden und der Zeitfaktor von 12 Stunden Versuchsdauer mit den 8 Erstickungsphasen wegfällt..

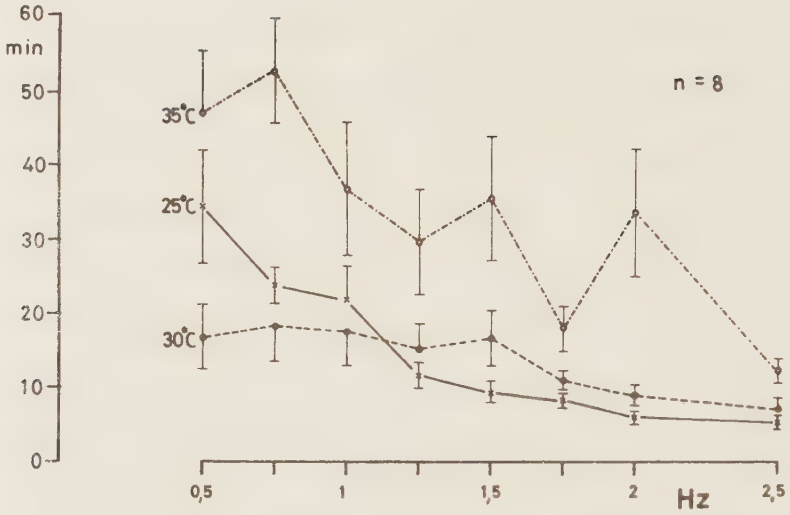



Abb.19: Die Zeit bis zum Erlöschen der Kontraktionsarbeit elektrisch gereizter linker Herzvorhöfe nach akuter Anoxie bei verschiedenen Frequenzen und Temperaturen (ANOXIETOLERANZ).
Mittelwerte aus randomisierten Versuchen über eine Versuchsdauer von 12 Stunden, mit 8 Erstikkungsphasen und aeroben Erholungsphasen von je einer Stunde.

### 3.1.2.2. Der Anoxietest

Nachdem in den vorigen Versuchen das Optimum der Anoxietoleranz bestimmt war, interessierte nun der zeitliche Verlauf der Kontraktionskraft in Anoxie, um bei Zugabe von Agentien Einwirkungen auf die anoxische Restkontraktionskraft und den Energiestoffwechsel zu prüfen. Es wurde daher im Folgenden nur noch sehr begrenzt die Anoxie-

toleranz geprüft. Hingegen wurde nun der Effekt auf die Kontraktionskraft während eines Zeitraumes von 2 Stunden Anoxie beobachtet (= "Anoxietest" genannt). Der Versuchsablauf erfolgte wie unter 2.1.2.5. (Abb.8) beschrieben. Dieser Anoxietest ermöglichte es, den Effekt von Pharmaka und Präcursoren des Adenosinstoffwechsels funktionell und biochemisch miteinander zu vergleichen. Die funktionellen Bestimmungen der Kontraktionsarbeit/Schlag ($A_S$) sowie die biochemischen Analysen wurden zu den definierten Zeitpunkten durchgeführt (siehe 2.1.2.5.).

3.1.2.2.1. Verlauf und Beeinflußbarkeit der Kontraktionskraft in Anoxie bei 35°C und 0,5 Hz und folgender Normoxie (Anoxietest).

Abb.20 zeigt eine Originalregistrierung eines Versuches mit einem linken elektrisch gereizten Herzvorhof, der mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz bei 35°C gereizt wurde. Nach einstündiger Versuchsdauer unter Normoxie (= Zeitpunkt 1) wurde die Begasung von 95% $O_2$/5% $CO_2$ auf 95% $N_2$/5% $CO_2$ umgeschaltet und somit strenge anaerobe Bedingungen geschaffen. Kurz nach dem Umschalten auf 95% $N_2$/5% $CO_2$ zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($P<0,005$) der Kontraktionskraft von 100% auf 140%, die dann innerhalb der folgenden 15 bis 20 Minuten signifikant ($P<0,001$) auf 20% des Ausgangswertes abfiel. Im weiteren Verlauf der Anoxie zeigte sich jedoch eine Erholungsphase und ein signifikanter Wiederanstieg ($P<0,005$) der Kontraktions-

kraft auf 50% bis 80% des aeroben Ausgangswertes. Dieser Wert wurde etwa nach einer Stunde Anoxie erreicht (= Zeitpunkt 2) und hielt sich überraschenderweise bis zu 2 Stunden unter Anoxie stabil. Nach zwei Stunden Anoxie (= Zeitpunkt 3) wurde wieder auf Normoxie umgeschaltet.

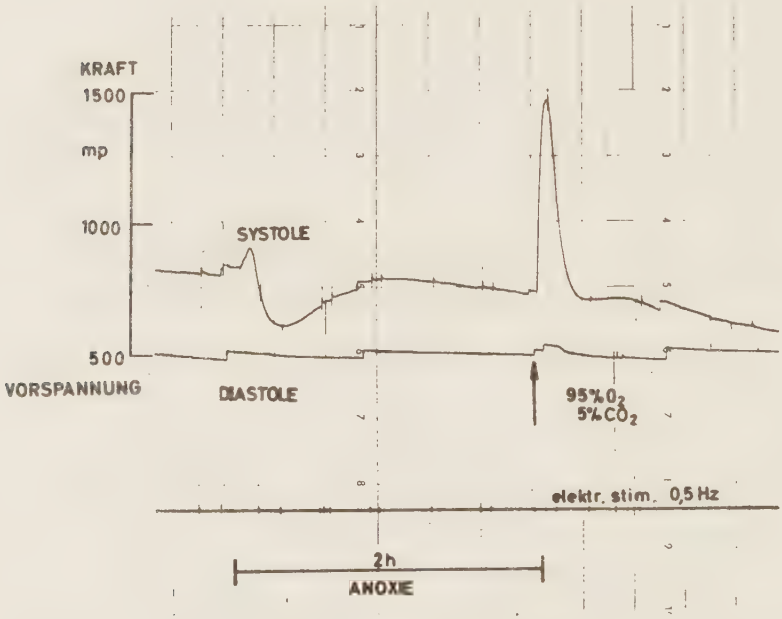



Abb.20: Originalregistrierung eines Versuches zur Veränderung der Kontraktilität bei Normoxie und akuter Anoxie.

Die Kontraktionskraft nimmt kurzfristig signifikant in Form eines Peaks zu ($P < 0{,}001$) auf etwa 450% des mittleren aeroben Ausgagswertes, um in den darauffolgenden 11/2 Stunden auf Kontrollwerte unter Normoxie abzufallen. Auffällig ist, daß paradoxerweise während der Anoxie die

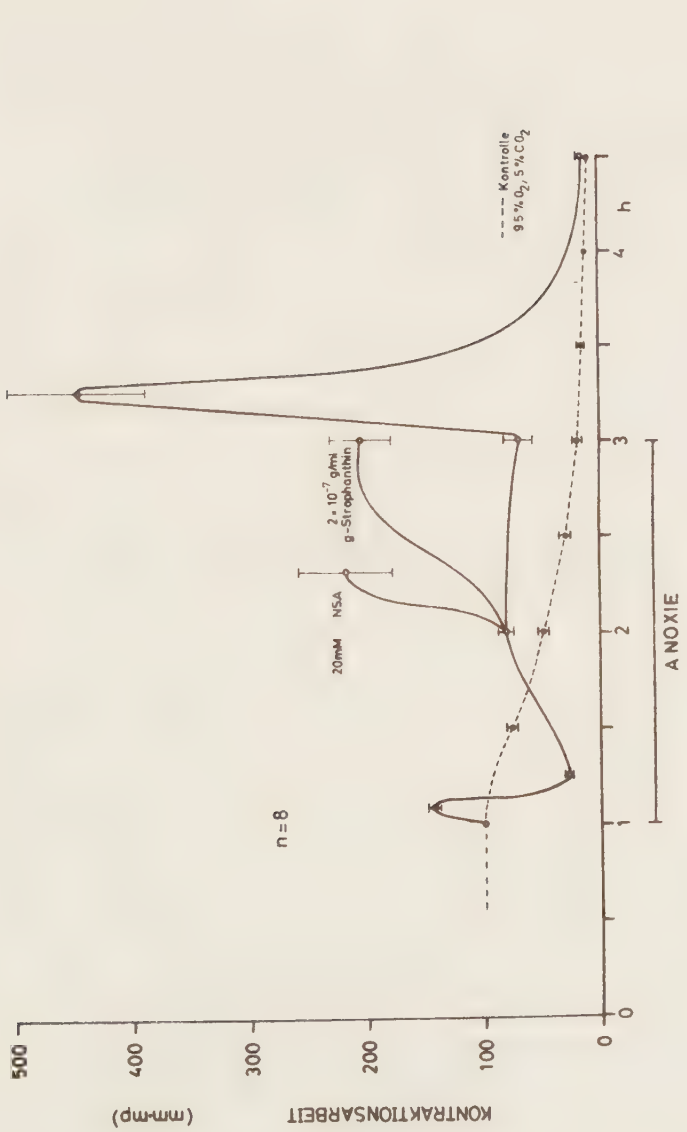



Abb.21: Veränderung der Kontraktilität bei Normoxie, Anoxie, Zugabe von (I) $2 \times 10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin und (II) 20 mM Nicotinsäureamid in akuter Anoxie.

"Ermüdung" des Präparates nicht so stark auftritt wie unter Normoxie.Die Kontraktionskraft der Herzvorhöfe unter Normoxie liegt nach ein bis zwei Stunden unter der Kontraktionskraft der Herzvorhöfe unter anaeroben Bedingungen. Obwohl die "Ermüdung" unter Anoxie nicht so stark auftritt wie unter Normoxie, macht sie sich jedoch wieder bemerkbar beim Umschalten von Anoxie auf Normoxie, sodaß nach 41/2 stündiger Versuchsdauer Werte erreicht werden, die sich von denen der Kontrollen (in Abb.21 gestrichelt eingezeichnet, n=8) nicht unterscheiden.

3.1.2.2.2. g-Strophanthin mit Verlängerung der Anoxietoleranz.

Aus vorangegangenen Untersuchungen wurde deutlich, daß bei 0,5 Hz und 35°C die Kontraktionskraft in der Anoxie noch etwa 50 bis 80% der Kontraktionsdraft unter Normoxie beträgt (Abb.21, n=8).
Durch Zugabe von $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin beim Zeitpunkt 2 konnte die Kontraktionskraft unter Anoxie auf 209% des Ausgangswertes unter Normoxie gesteigert werden. (Abb.21). Diese gesteigerte Kontraktionskraft bewirkt eine Verlängerung der Anoxietoleranz. Ohne die Zugabe von g-Strophanthin konnte bereits nach 6,6 $\pm$ 1,55 (n=5) Stunden keine Kontraktion mehr gemessen werden, während bei Inkubation mit $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin die Kontraktionskraft über 21,2 $\pm$ 3,3 Stunden (n=6) erhalten bleibt.
Abb.22 zeigt einen Einzelversuch (Maximalwert). Durch Zu-

gabe von $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin wird die anaerobe Kontraktionskraft auf über 200% gesteigert die im weiterer Versuchsverlauf langsam abnimmt. Erst nach 14,5 Stunden ist der Ausgangswert unter Normoxie erreicht (gestrichelte Linie). Die Anoxietoleranz konnte hier auf 27,5 Stunden ausgedehnt werden (27,5 Stunden = Maximalwert) im Vergleich zu 8,8 Stunden des maximalen Kontrollwertes. Man sieht sehr deutlich, daß der Abfall der Kontraktionskraft bis zum Stillstand bei Kontrollversuch und nach Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin nahezu linear und parallel verläuft. Damit zeigt die "Ermüdung" in Anoxie einen deutlichen Unterschied gegenüber dem Verlauf der Abnahme der Kontraktionskraft unter Normoxie (Abb. 17 und 21).

Abb.22: Verlängerung der Anoxietoleranz nach Stimulierung mit g-Strophanthin (Einzelversuch).

3.1.2.2.3. 20 mM Nicotinsäureamid (NSA).

Zugabe von 20 mM Nicotinsäureamid zum Zeitpunkt 2 verursacht eine Steigerung der Kontraktionskraft unter Anoxie auf 219% des Ausgangswertes unter Normoxie (Abb.21). Diese gesteigerte Kontraktionskraft kann über mehrere Stunden aufrecht erhalten werden. Abb.23 zeigt eine Originalregistrierung eines Versuches, wobei die Kontraktionskraft unter Anoxie zuerst mit 20mM NSA und dann mit $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin zusätzlich gesteigert wurde. Die gesamte Anoxiedauer betrug hier 3 1/2 Stunden. Nach dem Umschalten von Anoxie auf Normoxie fanden wir hier erwartungsgemäß eine weitere Steigerung der Kontraktionskraft. Setzt man diesen Wert gleich 100% Kontraktionskraft, so beträgt die Kontraktionskraft unter NSA und g-Strophanthin in der Anoxie 60% dieses Wertes. Bei diesen Ergebnissen muß jedoch immer bedacht werden, daß die Kontraktionskraft unter Normoxie bei einer Schlagfrequenz von 0,5 Hz und $35^{o}C$ nur etwa 35% der maximalen pharmakologisch unbeeinflußten Kontraktionskraft, die bei einer Schlagfrequenz in Bereich von 2 bis 2,5 Hz bei $35^{o}C$ erreicht wird, beträgt.

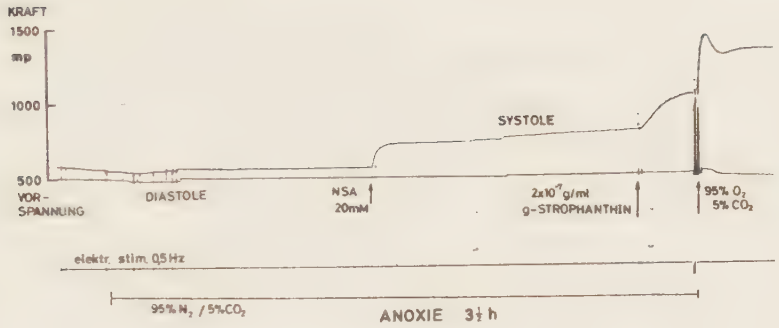



Abb.23: Steigerung der Kontraktilität unter Anoxie mit g-Stophanthin und Nicotinsäureamid auf 60% des Wertes der nach dem Umschalten auf Carbogen erreicht wird.

3.1.2.2.4. Carbochromen (Intensain$^{R}$) und Na-Decanoat.

Kurzkettige Fettsäuren wie Hexanoat werden in Aerobiose bevorzugt vor Glukose im Herzvorhof zur Energiegewinnung verbraucht (M.SIESS et al. 1970). Fettsäuren dringen in die Muskelzellen ein und beeinflussen durch ihre Calciumbindung möglicherweise die elektromechanische Koppelung, messbar als negativ inotropen Effekt. Von Carbochromen ist bekannt, daß es den Eintritt von langkettigen Fettsäuren in die Herzmuskelzellen hemmt und den von Glukose eher fördert. Es schien daher sinnvoll zu prüfen, inwieweit Carbochromen den negativ inotropen Effekt kurzkettiger Fettsäuren zu beeinflussen vermag. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

Nachdem sich die anaerobe Kontraktionskraft im Anoxietest

zum Zeitpunkt 2 stabilisiert hat auf 45% des Kontrollwertes unter Normoxie (Abb.24), wurden aufsteigende Konzentrationen von Carbochromen dem Nährmedium zugegeben (von $5x10^{-7}$ g/ml bis $5x10^{-5}$ g/ml). Bei einer Endkonzentration von $5x10^{-5}$ g/ml konnten wir im Anoxietest eine Steigerung der Kontraktionskraft von 45% auf 58% im Mittel beobachten, die auch durch Erhöhung der Endkonzentration nicht mehr weiter zu steigern war. Durch Zugabe von Na-Decanoat (0,05 mM bis 0,4 mM) konnte diese vermehrte anaerobe Kontraktionskraft wieder auf 18% des Kontrollwertes unter Normoxie reduziert werden. Zugabe von $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin konnte die Kontraktionskraft nur auf 50% des Ausgangswertes unter Normoxie steigern. Ohne Vorgabe von Carbochromen und Na-Decanoat wurden mit g-Strophanthin Steigerungswerte der Kontraktionskraft bis 209% des aeroben Ausgangswertes beobachtet (vgl. Abb.21). Beim Umschalten von Anoxie auf Normoxie stieg die Kontraktionskraft erst überschießend auf 431,3 ± 68,08%, um sich dann auf 292% des Kontrollwertes unter Normoxie einzustellen.

In einer zweiten Versuchsserie (Abb.25) wurde nach Einstellen der anaeroben Kontraktionskraft zum Zeitpunkt 2 (74% des aeroben Kontrollwertes) durch Zugabe von 0,1 mM Na-Decanoat die Kontraktionskraft zunächst auf 48% gesenkt. Dieser negativ inotrope Effekt konnte durch aufsteigende Konzentrationen von Carbochromen wieder aufgehoben werden. Somit war der Kontrollwert unter anaeroben Bedingungen wieder erreicht. Eine weitere Steigerung der anaeroben

Kontraktionskraft mit Carbochromen war nicht möglich.

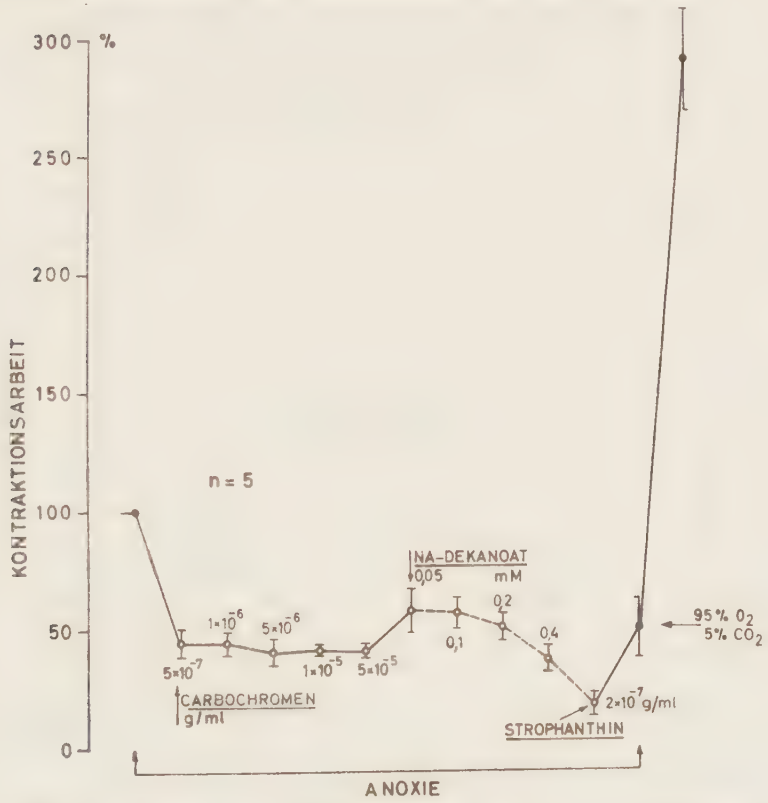



Abb.24: Prozentuale Veränderung der Kontraktionskraft im Anoxietest bei Zugabe von Carbochromen, Na- Decanoat und g-Strophanthin.

In einer dritten Versuchsserie (Abb.26) wurde im Anoxietest die anaerobe Kontraktionskraft zuerst durch $1x10^{-5}$ g/ml Carbochromen von 56% auf 78% des aeroben Kontrollwertes gesteigert. Zusatz von 0,1 mM Na-Decanoat verminderte die Kontraktionskraft auf 52%, Erhöhung der Na-De-

canoatkonzentration auf 0,2mM reduzierte diesen Wert noch weiter auf 31%. Eine weitere Erhöhung der Carbochromenkonzentration bis zu $5x10^{-5}$ g/ml blieb ohne Einfluß. Eine weitere Erhöhung der Na-Decanoatkonzentration reduzierte die anaerobe Kontraktionskraft soweit, daß die Werte nicht mehr registriert werden konnten. Jedoch konnten optisch noch minimale Aktionen der Herzvorhofspitzen beobachtet werden.

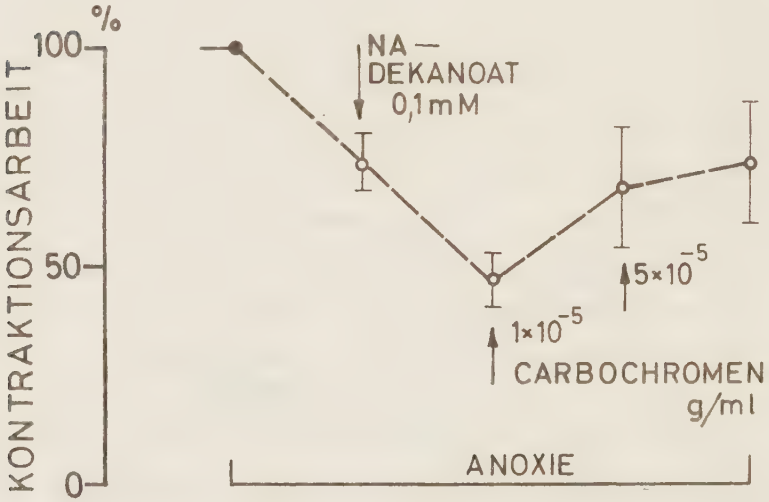



Abb.25: Prozentuale Veränderung der Kontraktionskraft im Anoxietest. Der negativ inotrope Effekt von 0,1mM Na-Decanoat kann durch eine Endkonzentration von $5x10^{-5}$ g/ml Carbochromen aufgehoben werden.

Nach dem Umschalten auf Normoxie verbesserte sich die Kontraktionskraft sehr rasch, zuerst überschießend auf 451,9 ± 62,2% entsprechend dem beschriebenen Peak, um

sich dann auf 124% des initialen aeroben Kontrollwertes zunächst einzustellen. In Aerobiose scheint damit der negativ inotrope Effekt von Na-Decanoat gegenüber der positiv intropen Wirkung von Carbochromen zurückzutreten.

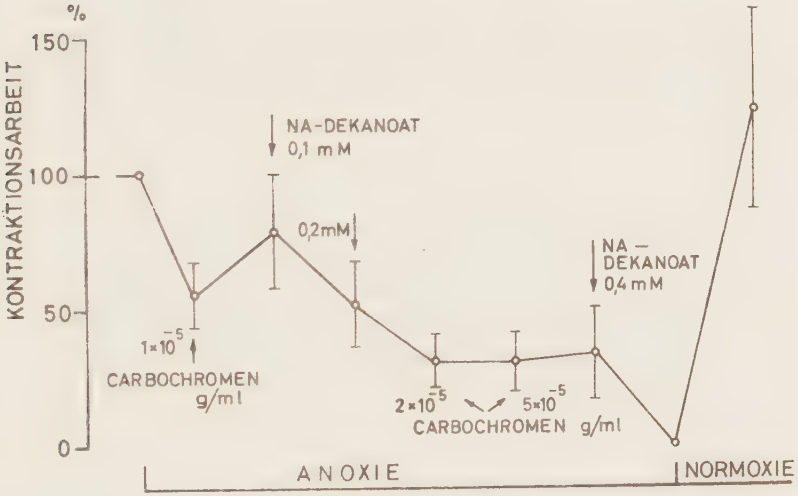



Abb.26: Veränderung der Kontraktionskraft im Anoxietest bei Zugabe von $1x10^{-5}$ g/ml Carbochromen und nachfolgender Zugabe von Na-Decanoat und Carbochromen.

3.1.2.2.5. $1x10^{-5}$M Theophyllin (Abb.28/IIa).

Zugabe von $1x10^{-5}$M Theophyllin zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 des Anoxietestes verursachte eine signifikante Steigerung der Kontraktionskraft ($P<0,001$; $n=6$; $\Delta\% = +127,49\%$) innerhalb der ersten 20 Minuten auf 104,10 ± 23,63% des normoxischen Kontrollwertes. Diese gesteigerte Kontraktionskraft fiel jedoch im Anoxietest bis

zum Zeitpunkt 3 signifikant ($P<0,02$) ab. Zum Zeitpunkt 3 konnte kein signifikanter Unterschied mehr zu den anoxischen Kontrollwerten nachgewiesen werden ($P>0,05$; $n=6$) obwohl der Wert noch 40,45% darüber lag.

3.1.2.2.6. 15 mM Glukose (Endkonzentration = 30 mM).

Aus Abbildung 28/IIb wird deutlich, daß eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Nährmedium von 15 mM auf 30 mM zum Zeitpunkt 2 des Anoxietestes innerhalb von 10 Minuten eine Zunahme der Kontraktionskraft um 51,09% bewirkt, allerdings nur in 3 von 6 Versuchen. Zum Zeitpunkt 3 war die Kontraktionskraft noch 30,49% höher als die vergleichbaren anaeroben Kontrollwerte. Diese Werte konnten jedoch nicht statistisch gesichert werden (in beiden Fällen $0,1 < P < 0,05$; $n=6$).

3.1.2.2.7. 1 mM Creatin.

a.) Normoxie (Abb.27a)

Zugabe von 1 mM Creatin zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 verursachte einen signifikant geringeren Abfall der Kontraktionskraft (Ermüdung) ($P<0,001$; $n=6$), sodaß zum Zeitpunkt 3 die Kontraktionskraft bei Inkubation mit 1 mM Creatin nur um 18,42% abfiel, während die Kontraktionskraft der normoxischen Kontrollen im gleichen Zeitraum um 64,27% abfiel auf 18,56 ± 4,56% des anfänglichen normoxischen Ausgangswertes zum Zeitpunkt 1. Bei Inkubation mit 1 mM Creatin konnte kein signifikanter Unterschied

(P>0,9; n=6) zwischen der Kontraktionskraft zum Zeitpunkt 2 und Zeitpunkt 3 nachgewiesen werden.

b.) Anoxie (Abb. 28/IIc.)

Zugabe von 1 mM Creatin zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 des Anoxietestes hatte keinen Effekt auf die anoxische Kontraktionskraft (P>0,98; n=6). Die Werte der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe lagen innerhalb der Streubreiten.

3.1.2.2.8. 15 mM Ribose (Abb.28/Ia).

Zugabe von 15 mM Ribose zum Zeitpunkt 2 des Anoxietestes bewirkte innerhalb von 10 Minuten eine signifikante Steigerung der Kontraktionskraft um 88,82% (P<0.001; n=6). Bis zum Zeitpunkt 3 war diese gesteigerte Kontraktionskraft jedoch wieder abgefallen auf Werte die sich statistisch nicht von den anoxischen Kontrollen unterscheiden (P>0,5; n=6).

3.1.2.2.9. 0,1 mM Adenin.

a.) Normoxie (Abb.27b)

Zusatz von 0,1 mM Adenin zum Zeitpunkt 2 verursachte unter Normoxie innerhalb von 10 Minuten eine signifikante Steigerung der Kontraktionskraft um 110,74% (P<0,05; n=6). Zum Zeitpunkt 3 war diese infolge der Ermüdung wieder leicht abgefallen, lag aber noch signifikant (P<0.05; n=6) über den Werten der normoxischen Kontrollen.

b.) Anoxie (Abb.28/Ib.)

Zugabe von 0,1 mM Adenin zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 des Anoxietestes bewirkte innerhalb von 10 Minuten eine signifikante Steigerung der Kontraktionskraft um 127,62% ($P<0,005$; $n=6$) auf 104,16 ± 14,55% des anfänglichen normoxischen Kontrollwertes. Diese nahm infolge der Ermüdung bis zum Zeitpunkt 3 wieder ab, sodaß statistisch kein Unterschied mehr zu den anoxischen Kontrollen nachgewiesen werden konnte ($P>0,05$; $n=6$).
Durch Zusatz von 0,1 mM Adenin zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 konnte zwischen der normoxischen und der anoxischen Kontraktionskraft kein signifikanter Unterschied mehr nachgewiesen werden ($P>0,7$; $n=6$). Vergleiche hierzu Abb.28/Ib. und Abb. 27b.

3.1.2.2.10. 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose.

a.) Normoxie (Abb.27c.)

Durch Hinzufügen von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 konnte die normoxische Kontraktionskraft innerhalb von 10 Minuten signifikant auf 173,76% des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 1 gesteigert werden ($P<0,001$; $n=6$; $\Delta\% = + 234,56\%$). Diese fiel infolge der Ermüdung bis zum Zeitpunkt 3 auf 91,99 ± 20,31% des normoxischen Ausgangswertes zurück. Dieser Wert liegt noch signifikant über den vergleichbaren normoxischen Kontrollen zum vergleichbaren Zeitpunkt, ($P<0,001$; $n=6$; $\Delta\% = + 395,65\%$) und signifikant über der Kontraktionskraft, die um Zeitpunkt 2 vor Zugabe von 0,1 mM Adenin

+ 15 mM Ribose erreicht wurde ($P<0.001$; $n=6$; $\Delta\% = +77{,}12\%$).

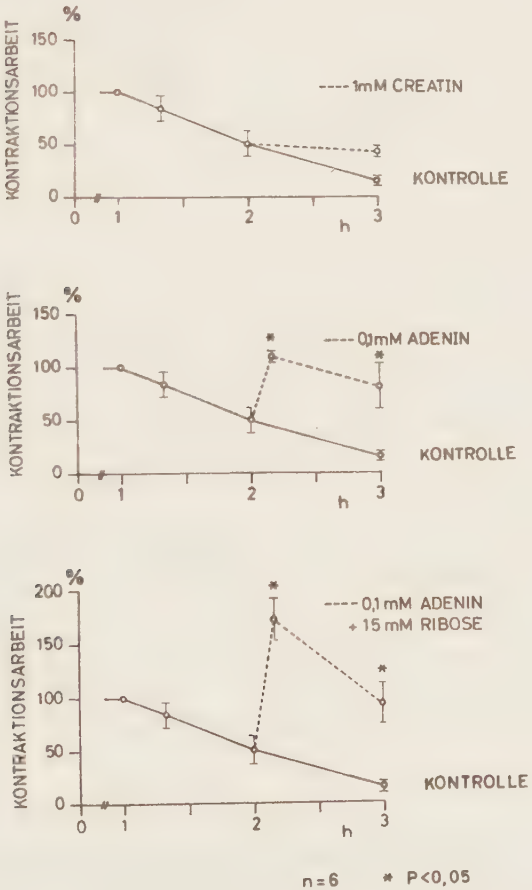



Abb.27: Die prozentuale Veränderung der Kontraktionskraft in Normoxie durch a.) 1 mM Creatin; b.) 0,1 mM Adenin, und c.) 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose im Vergleich zur Kontrolle bei 35°C und einer Reizfrequenz von 0,5 Hz.

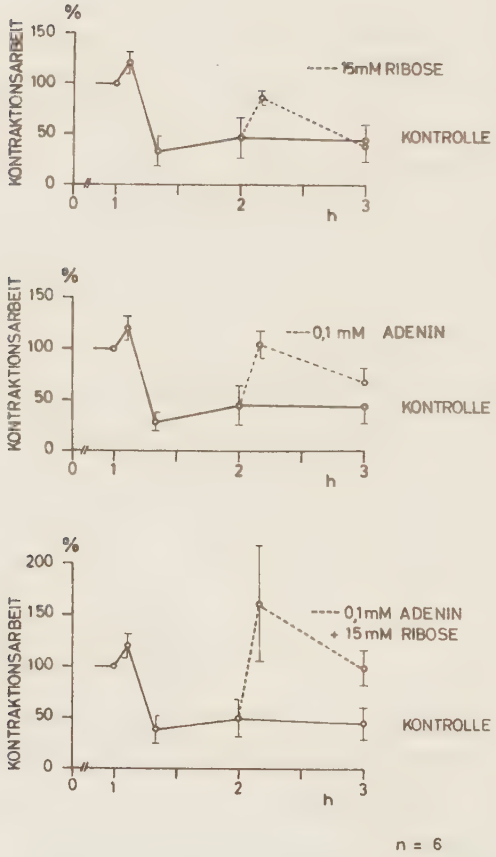



Abb.28/I: Die prozentuale Veränderung der Kontraktionskraft im Anoxietest durch Zugabe von a.) 15 mM Ribose, b.) 0,1 mM Adenin und c.) 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose im Vergleich zur Kontrolle.

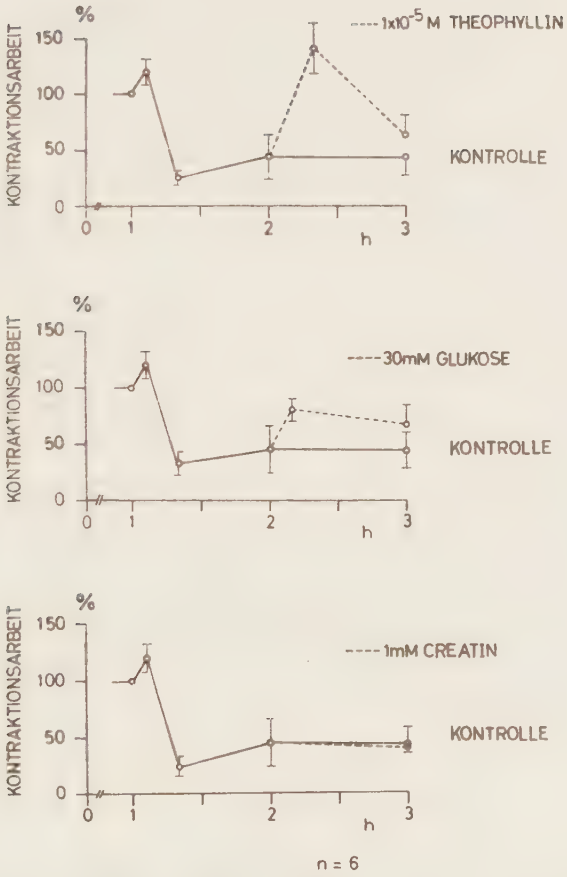



Abb.28/II: Die prozentuale Veränderung der Kontraktionskraft im Anoxietest durch Zugabe von a.) 1 x $10^{-5}$M Theophyllin, b.) + 15 mM Glukose (Endkonzentration = 30 mM) und c.) 1 mM Creatin im Vergleich zur Kontrolle.

b.) Anoxie (Abb. 28/Ic.).

Zugabe von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose zum Nährmedium zum Zeitpunkt 2 im Anoxietest verursacht innerhalb von 10 Minuten eine signifikante Steigerung der anaeroben Kontraktionskraft auf 160,39 ± 59,23%, bezogen auf den normoxischen Kontrollwert ($P<0,005$; $n=6$; $\Delta\% = + 250,50\%$). Infolge der Ermüdung fällt dieser Wert bis zum Zeitpunkt 3 ab auf 98,75 ± 16,83%, liegt jedoch noch signifikant über der Kontraktionskraft der anaeroben Kontrollwerte ($P<0.02$; $n=6$; $\Delta\% = + 121,81\%$) und auch signifikant über der Kontraktionskraft, die vor Zugabe erreicht wurde ($P<0.02$; $n=6$; $\Delta\% = + 115,80\%$).
Durch Hinzufügen von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose konnte zum Zeitpunkt 3 statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen der normoxischen und der anoxischen Kontraktionskraft nachgewiesen werden. Vergleiche hierzu Abb. 27c und 28/Ic.

## 3.2. Biochemische Untersuchungen.

### 3.2.1. Verschiebungen der Elektrolytkonzentrationen des Herzvorhofes im Anoxietest bei 35°C.

Die Erhaltung der, wenn auch reduzierten Kontraktionskraft während der Anoxie ist nur möglich, wenn das Ruhepotential noch soweit erhalten ist, daß ein Aktionspotential mit den Folgeerscheinungen der elektromechanischen Koppelung noch möglich ist. Aus diesem Grund wurden die Elektrolytgehalte an $Na^+$, $K^+$ und $Ca^{++}$ in der Herzmuskelzelle untersucht, um den Grad der Auswirkungen der Anoxie auf die Kontraktionskraft mit dem Grad der Elektrolytverschiebungen zu vergleichen. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß zu den verschiedenen Meßpunkten jeweils 4 linke Herzvorhöfe untersucht wurden. ( Vgl. 2.2.1.1.) Die Funktionskurve wurde dabei bei jeweils 2 Herzvorhöfen wie üblich registriert, die anderen beiden Herzvorhöfe standen ohne Registrierung der Kontraktionsarbeit unter der entsprechenden Vorspannung. Die Ergebnisse sind in Abb.29 aufgezeichnet.

Natrium:

Während der ersten Stunde Normoxie fanden wir einen Abfall des Na-Gehalts von 87,1 ± 5,8 auf 66,8 ± 3,2 mM/Kg FG. Bei der geringen Versuchszahl von n=4 ist dieser Wert nicht statistisch zu sichern. Mit Beginn der Erstickung (Anoxie) zeigt sich ein leichter Anstieg des Na-Gehalts auf 77,1 ± 5,7 mM Kg FG, der allerdings innerhalb der 2 Stunden Anoxie nicht weiter ansteigt. In der folgenden

Aerobiose verändert sich dieser Wert nicht mehr signifikant, liegt aber deutlich über den Sauerstoffkontrollen (in Abb.29 gestrichelt eingezeichnet).

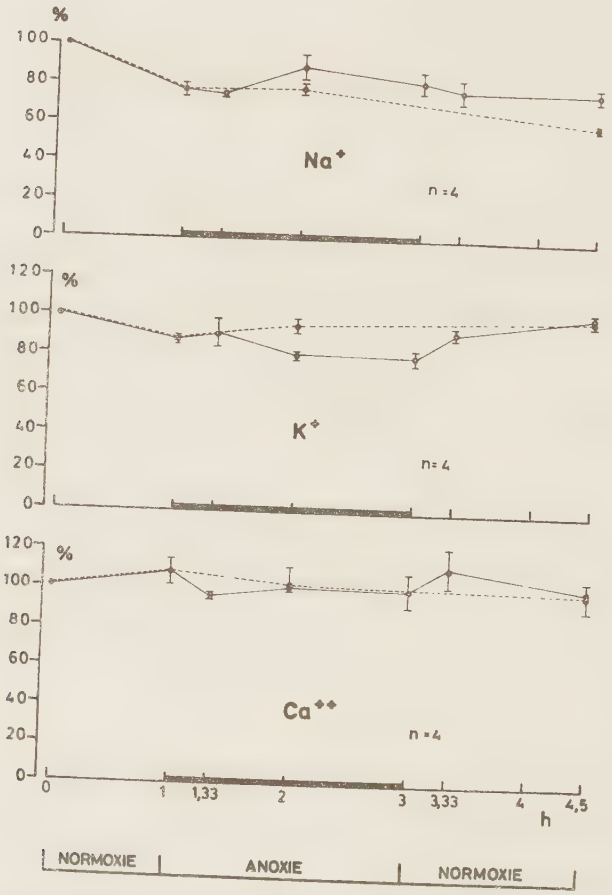



Abb.29: Prozentuale Verschiebung der Elektrolytkonzentrationen einer Versuchsgruppe unter Anoxie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unter Normoxie bei 35°C und 0,5 Hz.

Kalium:

Die Veränderungen der $K^+$-Gehalte während der 4 1/2 h unter Normoxie sind signifikant von den Initialwerten verschieden. Unter Erstickung kommt es, wie zu erwarten, zu einem signifikanten Abfall des Kaliumgehaltes von 73,2 ± 1,6 auf 66,96 ± 1,31 mM/Kg FG, der sich gegensinnig zu der Anreicherung von Natrium verhält. Nach dem Umschalten auf Normoxie und einer erwartungsgemäßen Steigerung der Kontraktionskraft (vgl. Abb.21) nimmt der Kaliumgehalt innerhalb von 1 1/2 Stunden wieder zu bis auf Werte die denen der Kontrollen unter Normoxie (in Abb.29 gestrichelt eingezeichnet) entsprechen.

Calcium:

Der Calciumgehalt ändert sich während der 4 1/2 stündigen Beobachtungszeit in Normoxie nicht signifikant. Unter Anoxie wird zum Zeitpunkt der geringsten Kontraktionsamplitude (=Meßpunkt 2) eine leichte Erniedrigung des Calciumgehalts von 1,99 ± 0,10 auf 1,75 ± 0,2 mM/Kg FG gemessen, die aber nicht statistisch gesichert ist. Während der Erholungsphase der anoxischen Kontraktionskraft zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3 steigt der Calciumgehalt, sodaß er in der zweiten Stunde der Anoxie von den Sauerstoffkontrollen (in Abb.29 gestrichelt eingezeichnet) nicht zu unterscheiden ist. Zum Zeitpunkt des überschießenden Kontraktionspeaks auf 450% des initialen Ausgangswertes unter Normoxie beim Umschalten von Anoxie auf Normoxie wurde nach etwa 20 Minuten ein höherer

Calciumgehalt (2,0 ± 0,18 mM/Kg FG) beobachtet, der nach 1 1/2 Stunden wieder zur Norm absinkt (= 1,88 ± 0,09 mM/Kg FG).

3.2.2. Die L — Laktatbestimmung im Anoxietest bei 35°C.

Bekanntlich ist die anaerobe Glykolyse, mit der Bildung von L — Laktat, der einzige Energiespender während der Anaerobiose. Da Laktat anaerob nicht weiterverarbeitet und die Muskelzellen leicht verlassen kann, wurde die Anhäufung des Laktats im Nährmedium bestimmt.

3.2.2.1. Inkubation mit 15 mM Glukose und Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin.

Bei Anwesenheit von 15 mM Glukose im Nährmedium kann während der Anoxie eine reduzierte Kontraktionskraft aufrecht erhalten werden (Abb.30). Während der Kontraktionstätigkeit in der Anoxie fanden wir innerhalb von 2 Stunden einen Anstieg von 240 n Mol auf 8200 n Mol Laktatgehalt in der Nährlösung. Eine Steigerung der Kontraktionskraft von über 100% durch Zugabe von $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin zum Zeitpunkt 2 des Versuches verursachte keine signifikant beschleunigte Laktatproduktion (8770 n Mol nach 2 Stunden).

Unter Normoxie nimmt die Kontraktionskraft der Kontrollen im Laufe des vergleichbaren Zeitraumes stetig ab, sodaß nach 3 Stunden Versuchsdauer nur noch 25% des Ausgangswertes beobachtet werden. Die Kontraktionskraft unter

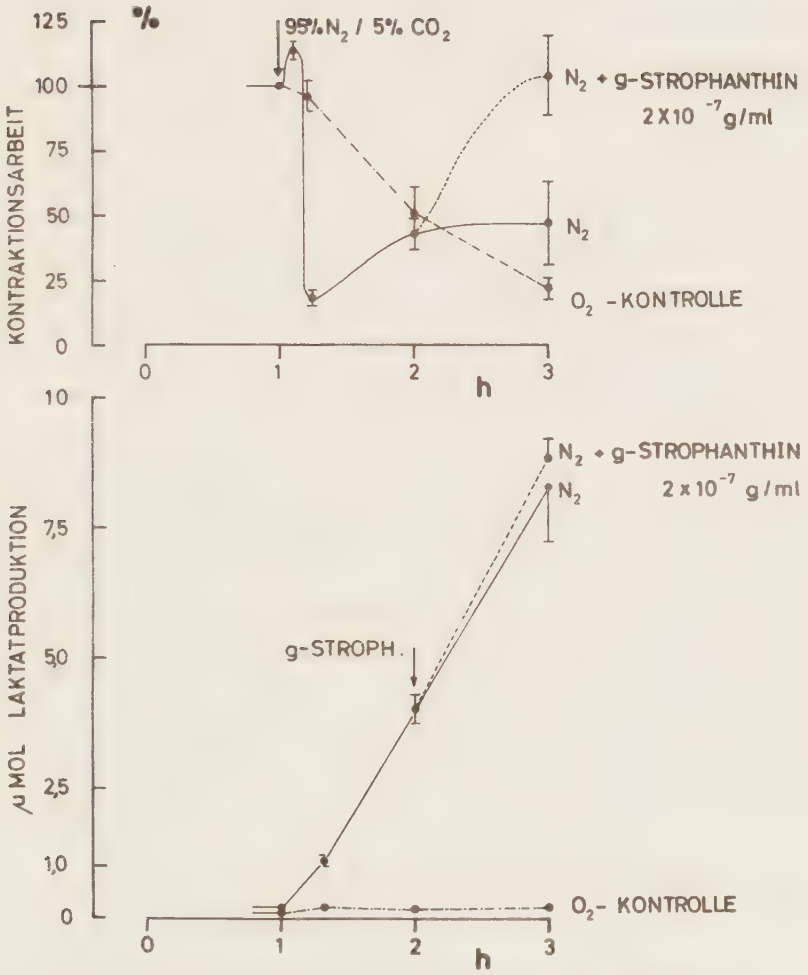



Abb.30: Veränderung des Laktatgehalts im Muskelbad im Anoxietest bei 35°C und 0,5 Hz bei Stimulation der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin im Vergleich zur Kontrolle. :-.-.-. Kontrolle unter Normoxie ohne g -Strophanthin. (n=6)

Normoxie liegt damit parodoxerweise unter dem Wert der Kontraktionskraft unter anaeroben Bedingungen. Der Laktatgehalt im Muskelbad dagegen bleibt etwa konstant (240 n Mol), d.h. Bildung und Oxidation halten sich im Gleichgewicht.

3.2.2.2. Inkubation mit 30 mM Glukose, Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin im Anoxietest und in Normoxie mit folgender Steigerung der Schlagfrequenz.

Um festzustellen ob die Energiebereitstellung in der Anoxie bei einem Glukoseangebot von 15 mM Glukose ausreicht, wurde eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Muskelbad von 15 mM auf 30 mM durchgeführt. Dieses hatte während der Anoxie nur eine kurze positiv inotrope Wirkung auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels, wahrscheinlich ein osmotischer Effekt. Die Laktatproduktion bei dieser erhöhten Glukosekonzentration (30 mM) unterscheidet sich nicht signifikant ($0,1 < P < 0,005$) von der bei der Glukosekonzentration von 15 mM.

Eine Erhöhung der Kontraktionskraft bei einem Angebot von 30 mM Glukose mit $2 \times 10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin verursacht auch in diesem Falle keine Veränderung der Glykolysegeschwindigkeit. Nach insgesamt 3,5 Stunden Kontraktionstätigkeit unter anaeroben Bedingungen wurde auf Normoxie umgeschaltet, wobei erwartungsgemäß die Kontraktionskraft zunächst überschießend anstieg, und

entsprechend der g-Strophanthinwirkung sich nach einer Stunde Normoxie auf 260% einstellte. Die Laktatproduktion bei 0,5 Hz sinkt erwartungsgemäß während dieser Stunde Normoxie von 17,64 ± 0,98 auf 4,40 ± 2,05 µ Mol/h x 100 mg FG signifikant ab. Dieser Wert liegt aber signifikant über der Laktatproduktion der Sauerstoffkontrollen (o,77 ± 0,20 µ Mol/h x 100 mg FG) bei gleicher Frequenz, allerdings ohne Leistungssteigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin.

Die Steigerung der Laktatproduktion entspricht annähernd der vierfach erhöhten Kontraktionskraft durch g-Strophanthin.

Eine Steigerung der Schlagfrequenz von 0,5 Hz auf 1,5 Hz unter Normoxie verursacht nur einen kurzen positiv inotropen Effekt mit nachfolgendem stetigen Abfall der Kontraktionskraft, sodaß auch die gesteigerte Leistung/Stunde ($A_h$) abfällt. Die Laktatproduktion nach Frequenzsteigerung liegt mit 5,88 ± 3,85 u Mol/h x 100 mg FG gegenüber 4,40 ± 2,05 u Mol/h x 100 mg FG leicht erhöht, doch ist dieser Wert bei der geringen Versuchszahl und der Streuung statistisch nicht zu sichern.

| Begasung | Meßpunkt | Laktatproduktion in µ Mol/hx100 mg FG | P | n |
|---|---|---|---|---|
| Anoxie F=0,5 Hz 15 mM Glukose | MP2-MP3 | 14,03±1,18 | | 4 |
| Anoxie F=0,5 Hz 30 mM Glukose | MP3-MP4 | 17,64±0,98 | 0,1>P>0,05 | 4 |
| Anoxie F=0,5 Hz 30 mM Glukose + $2x10^{-7}$g/ml g-Strophanthin | MP4-MP5 | 14,70±1,73 | P>0,975 | 4 |
| Normoxie F=0,5 Hz 30mM Glukose + $2x10^{-7}$g/ml g-Strophanthin | MP5-MP6 | 4,40±2,05 | 0,01>P>0,005 | 4 |
| Normoxie F=1,5 Hz 30 mM Glukose + $2x10^{-7}$g/ml g-Strophanthin | MP6-Mp7 | 5,88±3,85 | 0,05>P>0,025 | 4 |

Tabelle 1: Laktatproduktion von linken elektrisch stimulierten Herzvorhöfen bei Inkubation mit 30 mM Glukose und Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin im Anoxietest und einer Steigerung der Schlagfrequenz von 0,5 Hz auf auf 1,5 Hz unter Normoxie.

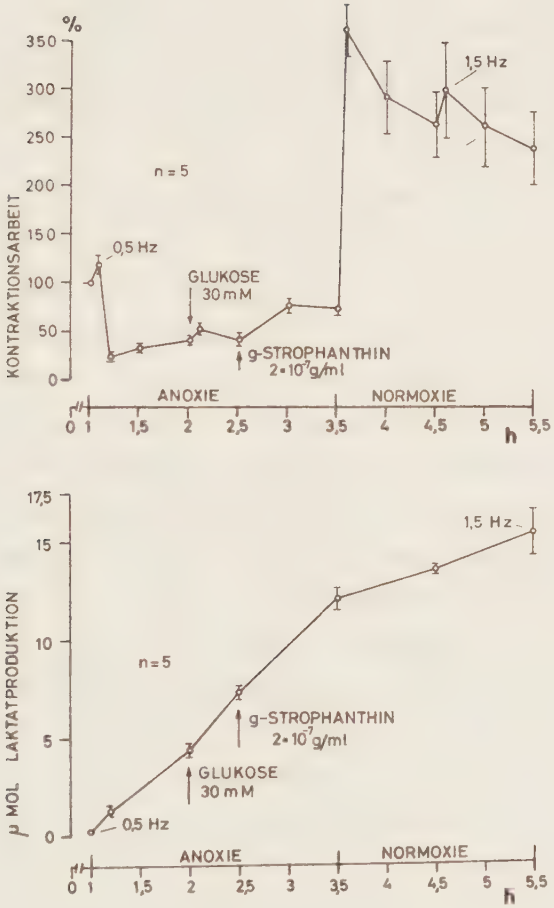



Abb.31: L —— Laktatbildung bei Inkubation mit 30 mM Glukose und Steigerung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin unter Anoxie und einer Steigerung der Schlagfrequenz unter Normoxie.

3.2.2.3. Laktatbildung an ruhenden unbelasteten und elektrisch gereizten Herzvorhöfen und ihre Beeinflussung durch Substrate der Adeninnucleotidsynthese und durch verschiedene cardiotone Pharmaka.

Bei dieser Untersuchung wurden zum Zeitpunkt 2 (=Meßpunkt 3 der Laktatbestimmung) im Anoxietest Substrate der Adeninnucleotidsynthese und verschiedene cardiotone Pharmaka dem Nährmedium hinzugefügt. Die Laktatproduktion während der folgenden Stunde Anoxie (Differenz zwischen MP 3 und MP 4) wurde mit den entsprechenden Kontrollgruppen ohne Zusatz unter gleichen Bedingungen verglichen. Unter Normoxie wurden zu gleichen Zeitpunkten wie unter Anoxie vergleichbare Probenvolumen als Kontrolle entnommen. Bei den Untersuchungen unter Normoxie wurden in dieser Serie keine Substrate der Adeninnucleotidsynthese oder cardiotone Pharmaka dem Nährmedium hinzugefügt. Die folgenden Zusätze wurden im Anoxietest zum Zeitpunkt 2 hinzugefügt:

a.) Ohne Zusatz, jedoch mit 15 mM Glukose im Nährmedium

b.) Glukose, Erhöhung der Glukosekonzentration von 15 mM auf 30 mM

c.) Adenin, 0,1 mM

d.) Ribose, 15 mM

e.) Adenin 0,1 mM + Ribose 15 mM

f.) Nicotinsäureamid, 20 mM

g.) Theophyllin, $1 \times 10^{-5}$ M

h.) g-Strophanthin, $2 \times 10^{-7}$ g/ml

3.2.2.3.1. Ruhende unbelastete Herzvorhöfe.

Linke Meerschweinchenherzvorhöfe wurden in der Apparatur bei 35°C (Beschreibung unter 2.1.2.2.4.) in 10 ml Krebs-Henseleit + 15 mM Glukose inkubiert. Unter Normoxie und Anoxie wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten Nährmediumproben von je 500 µl entnommen und auf den Laktatgehalt untersucht.

a.) Normoxie

Unter Normoxie ergibt sich zwischen der ersten und der dritten Stunde ein leichter kontinuierlicher Anstieg des Laktatgehalts in der Nährlösung, wobei die Werte der ruhenden unbelasteten Vorhöfe unter den Werten der belasteten schlagenden Vorhöfen liegen.

Vergleicht man die Laktatproduktion zwischen den einzelnen Meßpunkten, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

| Intervall | Laktatproduktion µ Mol/h x 100mg FG | P | n |
|---|---|---|---|
| MP 1 - MP 2 | 0,64 ± 0,19 | | 6 |
| MP 2 - MP 3 | 0,53 ± 0,12 | P> 0,7 | 6 |
| MP 3 - MP 4 | 0,77 ± 0.14 | P> 0,6 | 6 |

Tabelle 2: Laktatproduktion linker ruhender unbelasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie zwischen den einzelnen Meßpunkten umgerechnet auf µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht (FG).

b.) Anoxie

Im Anoxietest war ein signifikanter Anstieg der Laktatpro-

duktion im Vergleich zu den Kontrollen unter Normoxie zu verzeichnen. In der ersten Phase der Anoxie zwischen Meßpunkt 1 und Meßpunkt 2 fanden wir jedoch einen signifikant geringeren Anstieg der Laktatproduktion ($P<0.001$, $n=6$).

| Intervall | Laktatproduktion µ Mol/h x 100 mg FG | P | n |
|---|---|---|---|
| MP 1 - MP 2 | 3,74 ± 0,29 | | 6 |
| MP 2 - MP 3 | 5,77 ± 0,54 | P<0,001<br>Δ% = + 71,13%<br>(MP1/MP2) | 6 |
| MP 3 - MP 4 | 6,42 ± 1,24 | P>0,9<br>(MP2/MP3) | 6 |

Tabelle 3: Laktatproduktion linker ruhender unbelasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Anoxie zwischen den einzelnen Meßpunkten, umgerechnet auf µ Mol/h x 100 mg FG.

Zum Zeitpunkt 2 (Meßpunkt 3) wurde zum Nährmedium die unter 3.2.2.3. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka zugegeben. Die dadurch bedingten Veränderungen der Laktatproduktion zwischen MP 3 und MP 4 sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

| Zusatz | Laktatproduktion in µ Mol/h x 100 mg FG | P | Δ % | n |
|---|---|---|---|---|
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 0,78 ± 0,14 | P<0.005 | | 6 |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 6,42 ± 1,23 | | | 6 |
| $N_2$-Glukose (30mM Endkonz.) | 6,97 ± 1,16 | | + 8,56 | 6 |
| $N_2$-Adenin (0,1 mM) | 7,24 ± 1,31 | | +12,77 | 6 |
| $N_2$-Ribose (15 mM) | 8,98 ± 0,85 | | +39,88 | 6 |
| $N_2$-Ribose (15mM) + Adenin(0,1mM) | 9,92 ± 0,75 | P<0,05 | +54,52 | 6 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 8,06 ± 0,28 | | +25,55 | 6 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 7,92 ± 0,72 | | +23,36 | 6 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 7,88 ± 0,59 | | +22,74 | 6 |

Tabelle 4: Laktatproduktion linker ruhender Meerschweinchenherzvorhöfe unter Anoxie zwischen MP 3 und MP 4 bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmake, umgerechnet in µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht. Signifikanzen berechnet zur Kontrolle unter Anoxie.

Dabei zeigte sich, daß an ruhenden unbelasteten linken Meerschweinchenherzvorhöfen nur bei Inkubation mit Adenin (0,1 mM) + Ribose (15 mM) die Laktatproduktion mit 9,92 ± 0,75 µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht gegenüber den Kontrollen unter Stickstoff (6,42 ± 1,23 µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht) signifikant erhöht war (Δ% =+54,52%). Die Änderung bei Inkubation mit Ribose (15 mM) (Δ% =+39,88%) und Adenin (0,1 mM) (Δ% =+12,77%) ist nicht signifikant. Interessant ist, daß die Summe der prozentualen Laktatproduktion (39,88 + 12,77 = 52,65%) mit der signifikanten Steigerung bei Kombination von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose mit 54,52% vergleichbar ist.

3.2.2.3.2. Belastete elektrisch gereizte Herzvorhöfe.

Linke Meerschweinchenherzvorhöfe wurden bei 35°C in 10 ml Krebs-Henseleit + 15 mM Glukose inkubiert (Beschreibung unter 2.1.2.2.3.) und die Kontraktionskraft bei 0,5 Hz unter Normoxie und Anoxie registriert. Die Funktionskurve wurde dabei bei jeweils 2 Herzvorhöfen wie üblich registriert. Die anderen beiden Herzvorhöfe standen ohne Registrierung der Kontraktionsarbeit unter der gleichen Vorspannung (3.2.1.). Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Nährmediumproben von je 500 µl entnommen und auf den Laktatgehalt untersucht.

a.) Normoxie

Unter Normoxie ergibt sich zwischen der ersten und der dritten Stunde ein leichter kontinuierlicher Anstieg des

Laktatgehalts in der Nährlösung.

Vergleicht man die Laktatproduktion zwischen den einzelnen Meßpunkten, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

| Intervall | Laktatproduktion in µ Mol/h x 100 mg FG | P | n |
|---|---|---|---|
| MP 1 - MP 2 | 0,66 ± 0,16 | | 6 |
| MP 2 - MP 3 | 0,54 ± 0,18 | P > 0,6 | 6 |
| MP 3 - MP 4 | 0,79 ± 0,20 | P > 0,7 | 6 |

Tabelle 5: Laktatproduktion linker elektrisch gereizter (0,5 Hz) Meerschweinchenherzvorhöfe zwischen den einzelnen Meßpunkten, umgerechnet auf µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht.

Zwischen der Laktatproduktion bei ruhenden unbelasteten und schlagenden (0,5 Hz) belasteten (500 mp) linken Meerschweinchenherzvorhöfen konnte unter Normoxie kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

| Intervall | Laktatproduktion in µ Mol/h x 100 mg FG | | P | n |
|---|---|---|---|---|
| | ruhend unbelastet | schlagend belastet | | |
| MP 1 - MP 2 | 0,64 ± 0,19 | 0,66 ± 0,16 | P>0,90 | 6 |
| MP 2 - MP 3 | 0,53 ± 0,12 | 0,54 ± 0,18 | P>0,90 | 6 |
| MP 3 - MP 4 | 0,77 ± 0,14 | 0,79 ± 0,20 | P>0,975 | 6 |

Tabelle 6: Vergleich der Laktatproduktion ruhender, unbelasteter und schlagender, belasteter Herzvorhöfe in Normoxie.

b.) Anoxie

Im Anoxietest war ein starker Anstieg der Laktatproduktion im Vergleich zu den Kontrollen unter Normoxie zu verzeichnen. Auch hier war in der ersten Phase des Anoxietestes, zwischen Meßpunkt 1 und Meßpunkt 2, die Laktatproduktion gegenüber den beiden späteren Phasen signifikant geringer ($P<0,05$; $n=6$)

| Intervall | Laktatproduktion in u Mol/h x 100 mg FG | P | n |
|---|---|---|---|
| MP 1 - MP 2 | 9,09 $\pm$ 1,40 | $P<0,05$ | 6 |
| MP 2 - MP 3 | 13,75 $\pm$ 1,64 | | 6 |
| MP 3 - MP 4 | 15,30 $\pm$ 1,27 | $P>0,5$ | 6 |

Tabelle 7: Laktatproduktion linker elektrisch gereizter (0,5 Hz) belasteter (500 mp) Meerschweinchenherzvorhöfe im Anoxietest zwischen den einzelnen Meßpunkten, umgerechnet in µ Mol/h x 100 mg FG.

Zum Zeitpunkt 2 (= Meßpunkt 3) wurde zum Nährmedium die unter 3.2.2.3. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Phamaka zugegeben. Die dadurch bedingten Veränderungen der Laktatproduktion zwischen MP 3 und MP 4 sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

| Zusatz | Laktatproduktion in µ Mol/h x 100 mg FG | P | Δ % | n |
|---|---|---|---|---|
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 0,77 ± 0,20 | P<0,001 | | 6 |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose | 15,31 ± 1,27 | | | 6 |
| $N_2$-Glukose (30mM Endkonz.) | 13,88 ± 1,24 | | - 9,35 | 6 |
| $N_2$-Adenin (0,1 mM) | 14,72 ± 1,48 | | - 6,53 | 6 |
| $N_2$-Ribose (15 mM) | 15,56 ± 0,93 | | + 1,63 | 6 |
| $N_2$-Ribose (15mM) +Adenin (0,1mM) | 15,43 ± 2,51 | | + 0,78 | 6 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid(20mM) | 16,14 ± 1,62 | | + 5,42 | 6 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 16,55 ± 1,37 | | + 8,09 | 6 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 14,21 ± 1,12 | | -7,18 | 6 |

Tabelle 8: Laktatproduktion linker elektrisch gereizter (0,5 Hz) belasteter (500 mp) Meerschweinchenherzvorhöfe im Anoxietest zwischen MP 3 und MP 4 bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka, umgerechnet in µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht. Signifikanzen berechnet zur Kontrolle unter Anoxie.

Aus der Tabelle 8 ergibt sich, daß sich die Laktatproduktion in dem beobachteten Zeitraum durch die genannten Zusätze nicht signifikant ändert. Nicht einmal die beiden

Extremwerte ($N_2$-30mM Glukose, und $N_2$-Theophyllin; Δ% = + 19,24% bezogen auf den Glukosewert) differieren signifikant. Signifikante Unterschiede fanden wir jedoch im Vergleich der ruhenden unbelasteten zu den schlagenen (0,5 Hz) belasteten Vorhöfen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

| Zusatz | Laktatproduktion in µ Mol/h x 100 mg FG | | P | Δ % | n |
|---|---|---|---|---|---|
| | ruhend unbelastet | schlagend belastet | | | |
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 0,78±0,14 | 0,77±0,20 | P>0,7 | 1,2 | 6 |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 6,42±1,23 | 15,31±1,27 | P<0,005 | 41,89 | 6 |
| $N_2$-Glukose (30mM Endkonz) | 6,97±1,16 | 13,88±1,24 | P<0,005 | 50,24 | 6 |
| $N_2$-Adenin (0,1 mM) | 7,24±1,31 | 14,72±1,48 | P<0,005 | 49,23 | 6 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 8,98±0,85 | 15,56±0,93 | P<0,001 | 57,18 | 6 |
| $N_2$-Ribose(15mM) $N_2$-Adenin(0,1mM) | 9,92±0,75 | 15,43±2,51 | P<0,02 | 55,54 | 6 |
| $N_2$-Nicotinsäure-amid (20mM) | 8,06±0,28 | 16,14±1,62 | P<0,001 | 49,97 | 6 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 7,92±0,72 | 16,55±1,37 | P<0,001 | 47,83 | 6 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 7,88±0,59 | 14,21±1,12 | P<0,001 | 55,52 | 6 |

Tabelle 9: Vergleich der Laktatproduktion ruhender unbelasteter und schlagender belasteter Herzvorhöfe im Anoxietest zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4 bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka, umgerechnet in µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die Laktatproduktion in der Anoxie zwischen ruhenden, unbelasteten und schla-

genden, belasteten Herzvorhöfen um 41,89% bis 57,18% differiert, d.h. durch die Kontraktionsarbeit sich verdoppelt. Eine Beziehung zu der Leistungsverbesserung unter verschiedenen Substraten bzw. Pharmaka in Anoxie läßt sich dabei nicht nachweisen.

3.2.3. Die energiereichen Phosphate im Anoxietest.

3.2.3.1. Die Veränderung der Gehalte energiereicher Phosphate im Anoxietest bei Inkubation mit 15 mM Glukose im Nährmedium im Vergleich zur Normoxie (Abb.32).

Über die Energielage des Herzmuskels geben außer den Gehalten an $Na^+$ und $K^+$, die ein indirektes Maß für das Ruhepotential darstellen, am besten die energiereichen Phosphate ATP und Creatinphosphat (CP) Auskunft. Es ist bekannt, daß die Creatinphosphatkonzentration im Herzmuskelgewebe unter Anoxie zuerst abfällt, während der ATP-Zerfall zeitlich verschoben und in geringeren Ausmaß folgt. Ein Absinken des ATP-Gehalts unter 40% bis 50% des Ausgangswertes führt zu irreversiblen Schädigungen.

Im folgenden wurde untersucht, inwieweit die anaerobe Glykolyse bei Anwesenheit von 15 mM Glukose im Nährmedium zur Energiegewinnung ausreicht und in welchem Maße die energiereichen Phosphate während der beobachteten anaeroben Kontraktionsarbeit im Anoxietest beeinflußt werden. Zu jedem Meßpunkt (MP; n=6) wurden die Herzvorhöfe entsprechend 2.2.2.1. entnommen, bei -196°C einge-

froren und aufgearbeitet. Wir bestimmten am gleichen Herzvorhof den Gesamtgehalt von ATP, ADP, AMP, CP und CR in n Mol/mg Protein.

3.2.3.1.1. ATP

a.) Normoxie

Unter Normoxie fiel die ATP-Konzentration im Beobachtungsraum von 2 Stunden (zwischen MP 1 und MP 2) nur sehr langsam und ohne Signifikanz von 25,07 ± 0,68 auf 22,98 ± 2,28 n Mol/mg Protein ab, sodaß nach 2 Stunden Versuchsdauer noch 92% der anfänglichen ATP-Konzentration vorhanden sind.

b.) Anoxie

Unter Anoxie fanden wir in den ersten 20 Minuten (zwischen MP 1 und MP 2) einen signifikanten Abfall ($P<0,005$) von 25,07 ± 0,68 auf 20,83 ± 0.78 n Mol/mg Protein ($\Delta\% = -16,91\%$). In den folgenden 1,66 Stunden zwischen MP 2 und MP 4 fiel die ATP-Konzentration etwas langsamer aber signifikant ($P<0.001$) auf 15,15 ± 1,01 n Mol/mg Protein ($\Delta\% = -27,37\%$) ab, sodaß nach 2 Stunden Anoxie noch ca 60% der anfänglichen ATP - Konzentration, im Vergleich zum Ausgangswert, vorhanden waren.

3.2.3.1.2. ADP

a.) Normoxie

Unter Normoxie konnten wir im Verlauf des 2 stündigen Intervalles (=Kontrollgruppe) keine Veränderung der ADP-

Konzentration feststellen.

b.) Anoxie

Im Anoxietest fanden wir in den ersten 20 Minuten zwischen MP 1 und MP 2 einen signifikanten Anstieg ($P<0,02$) der ADP-Konzentration von 3,75 ± 0,25 auf 6,07 ± 0,59 n Mol/mg Protein ($\Delta$ % = + 61,87%). Dieser erhöhte Gewebespiegel änderte sich während des Beobachtungszeitraumes nicht mehr signifikant. Die ADP-Konzentration nach 2 Stunden Anoxie liegt mit 5,05 ± 0,50 n Mol/mg Protein signifikant über den Werten unter Normoxie ($P<0,05$).

3.2.3.1.3. AMP

a.) Normoxie

Unter Normoxie fanden wir einen Anstieg der AMP-Konzentration von 0.65 ± 0,09 auf 0.94 ± 0,10 n Mol/mg Protein ($\Delta$% = + 44,62%) der sich mit einem P von $0,1>P>0,05$ nicht statistisch sichern ließ.

b.) Anoxie

Im Anoxietest war in der ersten Stunde zwischen MP 1 und MP 3 ein signifikanter Anstieg ($P<0,01$) der AMP-Konzentration von 0,65 ± 0,09 auf 1,35 ± 0,12 n Mol/mg Protein zu verzeichnen. Ähnlich wie bei der ADP-Konzentration im Vorhofgewebe hielt sich auch dieser Wert im Verlauf der Anoxie auf der gleichen Höhe. Der Endwert 1,40 ± 0,109 n Mol/mg Protein ist noch signifikant ($P<0;001$) erhöht im Vergleich zu den Kontrollen unter Normoxie.

3.2.3.1.4. Adeninnucleotidpool (ATP + ADP + AMP).

a.) Normoxie

Unter Normoxie ist die Differenz während des Beobachtungsintervalles von 2 Stunden zwischen Meßpunkt 1 und Meßpunkt 4 nicht signifikant verschieden.

b.) Anoxie

Interessant ist, daß im Anoxietest sich der Gesamtadeninnucleotidpool in den ersten 20 Minuten (zwischen Meßpunkt 1 und Meßpunkt 2) bis zum Zeitpunkt der stärksten negativen Inotropie nicht signifikant verändert. In der folgenden Phase des Anoxietestes (zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3) mit Verbesserung der anoxischen Kontraktionskraft nimmt der Adeninnucleotidpool ab, um sich dann zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4 auf ein Plateau einzustellen.

Die Differenz im Anoxietest beträgt nach 2 Stunden anoxischer Kontraktionstätigkeit nur 26,81%. Dieser Abfall konnte statistisch gesichert werden ($P<0,005$).

3.2.3.1.5. CP

a.) Normoxie

Unter Normoxie fanden wir gegenüber dem Ausgangswert von 38,77 $\pm$ 2,22 n Mol/mg Protein nach 2 Stunden einen etwas höheren Wert von 45,22 $\pm$ 3,81 n Mol/mg Protein ($\Delta\%$ = + 16,64%). Diese Differenz ist jedoch statistisch nicht zu sichern.

b.) Anoxie

Im Anoxietest fanden wir innerhalb der ersten 20 Minuten zum Zeitpunkt der geringsten Inotropie zwischen Meßpunkt 1 und Meßpunkt 2 einen hochsignifikanten Abfall ($P<0,001$) der CP-Konzentration von 38,77 $\pm$ 2,22 auf 8,87 $\pm$ 1,06 n Mol/mg Protein ($\Delta\% = -77,12\%$). Im weiteren Versuchsverlauf fällt dieser Wert langsam zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 4 noch weiter und erreicht nach einer Anoxiedauer von 2 Stunden noch 3,50 $\pm$ 0,06 n Mol/mg Protein, sodaß nur noch 9,03% der anfänglichen CP-Konzentration vorhanden sind. Dieses Ergebnis konnte durch zwei weitere Versuchsserien bestätigt werden.

3.2.3.1.6. CR

a.) Normoxie

Unter Normoxie fanden wir hier einen Abfall der Creatinkonzentration von 21,59 $\pm$ 3,64 auf 14,27 $\pm$ 3,98 n Mol/mg Protein ($\Delta\% = -33,90\%$). Der Unterschied war bei einer Versuchzahl von n=5 nicht signifikant. Diese Abnahme der CR-Konzentration kann spekulativ als ein Zeichen der CP-Bildung unter Normoxie gewertet werden, da die Menge in n Mol absolut mit der allerdings nicht signifikanten Zunahme der CP-Konzentration unter Normoxie übereinstimmt.

b.) Anoxie

Unter Anoxie im Anoxietest dagegen stieg die CR-Konzentration signifikant ($P<0,005$) von 21,59 $\pm$ 3,64 n Mol/mg Protein in den ersten 20 Minuten zwischen Meßpunkt 1 und

Meßpunkt 2 auf 48,74 ± 5,92 n Mol/mg Protein ( % = 125,75%), um dann zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 4 des Versuches langsam abzufallen auf 41,95 ± 3,03 n Mol/mg Protein. Die Differenz zwischen dem höchsten Wert nach 20 Minuten und dem Wert, der nach 2 Stunden Anoxie erreicht wurde, (Δ% = - 13,93%) ist nicht signifikant.

3.2.3.1.7. Creatinpool (CP + CR)

a.) Normoxie

Unter Normoxie ist die Differenz während des Beobachtungsintervalles von 2 Stunden zwischen Meßpunkt 1 und Meßpunkt 4 nicht signifikant verschieden.

b.) Anoxie

Die Veränderungen des Creatinpools spiegeln das Verhalten des Adeninnucleotidpools auffallend ähnlich wieder. Auch hier kommt es bis zum Erreichen der geringsten Inotropie nach 20 Minuten zu keiner Änderung des Creatinpools. Während der Phase der Verbesserung der anoxischen Kontraktionskraft mit Einstellen eines Gleichgewichtes kommt es zum Absinken des Creatinpools nach einer Stunde, der sich während der folgenden Stunde anoxischer Kontraktionstätigkeit nicht mehr ändert. Die Differenz zwischen Ausgangswert (Meßpunkt 1) vor Erstickung und nach zwei Stunden Anoxie beträgt ähnlich wie beim Adeninnucletidpool nur 20,77% des Gesamtpools. Dieser Wert konnte statistisch gesichert werden (P<0,01).

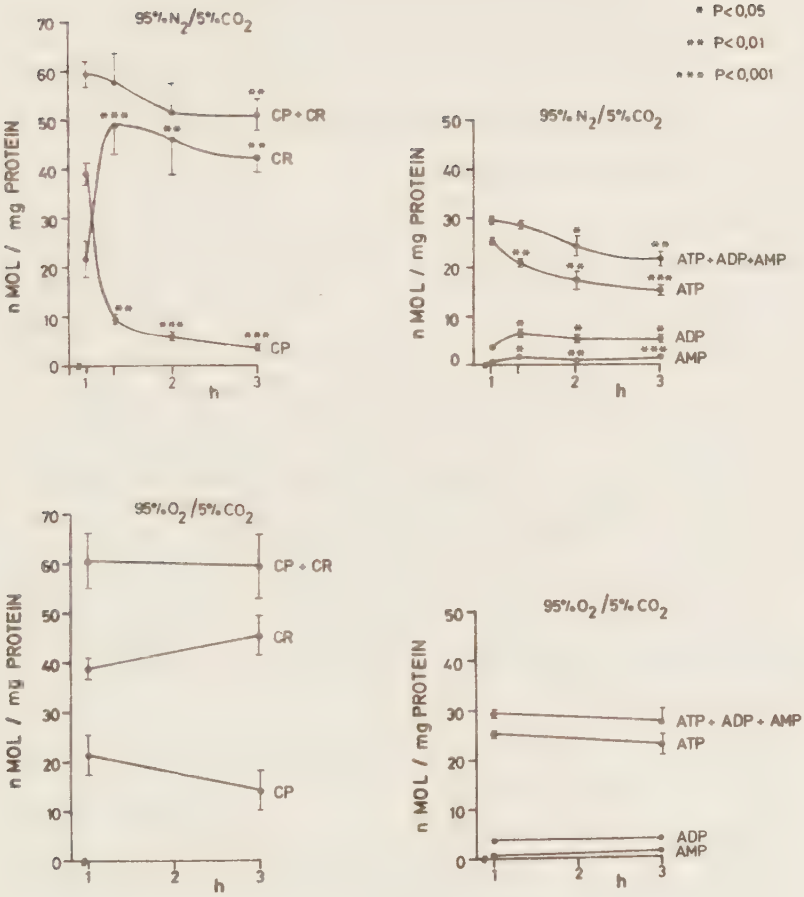



Abb.32: Veränderung der Gesamtgehalte der energiereichen Phosphate ATP, ADP, AMP, CP und CR im Anoxietest im Vergleich zur Normoxie.

3.2.3.2. Die Veränderung der energiereichen Phosphate ruhender unbelasteter, sowie elektrisch gereizter, belasteter Herzvorhöfe im Anoxietest und ihre Beeinflussung durch Substrate der Adeninnucleotidsynthese und durch verschiedene cardiotone Pharmaka.

Die Herzvorhöfe der Versuchsreihe aus 3.2.2.3. wurden zum Zeitpunkt 3 (= Meßpunkt 4) aus der Versuchskammer entnommen und aufgearbeitet (vgl. 2.2.2.1.). Die in den Tabellen 10 bis 18 dargestellten Werte stellen damit Endwerte nach 2 Stunden Anoxie dar, wobei die jeweilige Einwirkung der entsprechenden Substanz während der letzten Stunde Anoxie vor Fixierung des Herzvorhofes erfolgte. Die folgenden Substanzen wurden zugefügt:

a.) Ohne Zusatz, jedoch mit 15 mM Glukose im Nährmedium unter Normoxie (= $O_2$-Kontrolle)

b.) Ohne Zusatz, jedoch mit 15 mM Glukose im Nährmedium im Anoxietest (=$N_2$-Kontrolle)

c.) Glukose, Erhöhung der Glukosekonzentration von 15 mM auf 30 mM Endkonzentration.

d.) Adenin, 0,1 mM

e.) Ribose, 15 mM

f.) Adenin 0,1 mM + Ribose 15 mM

g.) Nicotinsäureamid, 20 mM

h.) Theophyllin, $1x10^{-5}$ M

i.) g-Strophanthin, $2x10^{-7}$ g/ml

3.2.3.2.1. Untersuchungen an ruhenden unbelasteten Herzvorhöfen (Tab. 10 bis 13).

3.2.3.2.1.1. ATP (Tab.10)

a.) Normoxie

Die ATP-Konzentration im Gewebe beträgt nach 3 Stunden Normoxie 16,63 $\pm$ 2,31 n Mol/mg Protein.

b.) Anoxie

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, beträgt zum gleichen Zeitpunkt wie die normoxische Kontrolle nach 2 Stunden Anoxie die ATP-Konzentration noch 12,25 $\pm$ 2,26 n Mol/mg Protein. Dieser Wert liegt damit nur um 26,34% niedriger als der Wert unter Normoxie. Zusatz der unter 3.2.3.2. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und verschiedener cardiotoner Pharmaka zeigte nur nach Adenin (0,1 mM), Nicotinsäureamid (20 mM) und Theophyllin ($1x10^{-5}$ M) höhere Werte, die aber nicht signifikant von der $N_2$-Kontrolle verschieden sind ($P>0,9$ in allen drei Fällen; n=5).

3.2.3.2.1.2. ADP (Tab. 10)

a.) Normoxie

Die ADP-Konzentration im Gewebe beträgt nach 2 Stunden Normoxie 3,82 $\pm$ 0,32 n Mol/mg Protein. Dieser Wert ist zu dem entsprechenden Wert unter Anoxie nicht signifikant verschieden ($P>0,8$).

b.) Anoxie

Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle bleibt der ADP-Gehalt im Gewebe unter Anoxie unverändert. Nur die Kombi-

nation von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose zeigt eine signifikant erhöhte ADP-Konzentration ($P<0,025$; $n=5$; $\Delta\% = +69,63\%$). Dieser Wert liegt höher als die vergleichbaren Werte unter Anoxie und Normoxie. Alle anderen Werte liegen dicht in der Streubreite ohne Signifikanz.

3.2.3.2.1.3. AMP (Tab.10)

a.) Normoxie

Die AMP-Konzentration im Gewebe beträgt nach 2 Stunden Normoxie 0,87 n Mol/mg Protein.

b.) Anoxie

Gegenüber der normoxischen Kontrolle ist der AMP-Gehalt unter Anoxie ( = 1,38 $\pm$ 0,19 n Mol/mg Protein) signifikant erhöht ($P<0,05$; $n=5$; % = + 58,62%). Bei Zusatz von g-Strophanthin erscheint die AMP-Konzentration gegenüber diesem Wert verringert ($0,5<P<0,1$ ; $n=5$; $\Delta\% = - 11,49\%$), dagegen bei Zusatz von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose signifikant erhöht ($P<0,05$; $n=5$; $\Delta\% = + 132,18$).

3.2.3.2.1.4. Adeninnucleotidpool (ATP+ADP+AMP) (Tab.11).

a.) Normoxie

Der Adeninnucleotidpool im Gewebe beträgt unter Normoxie zum Zeitpunkt 3 21,33 $\pm$ 2,23 n Mol/mg Protein.

b.) Anoxie

Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle zum Zeitpunkt 3 ist der Adeninnucleotidpool mit 17,23 $\pm$ 3,34 n Mol/mg Protein nicht signifikant verschieden ($0,3<P<0,4$; $n=5$;

| | ATP | | ADP | | AMP | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % |
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 16,63 ± 2,31 | | 3,82 ± 0,32 | | 0,77 ± 0,10 | |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 12,25 ± 2,64 | | 3,62 ± 0,73 | | 1,38 ± 0,19 | |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 12,63 ± 2,26 | + 3,1 | 3,61 ± 0,88 | - 0,28 | 1,28 ± 0,15 | - 7,25 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 14,86 ± 2,70 | +21,31 | 4,1 ± 0,60 | +13,19 | 1,34 ± 0,27 | - 2,90 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 10,84 ± 1,83 | -11,51 | 3,37 ± 0,61 | - 6,91 | 1,54 ± 0,13 | +11,59 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) + Ribose (15mM) | 13,50 ± 1,28 | +10,02 | 6,48 ± 0,95 | +79,01* | 2,02 ± 0,23 | +46,38 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 15,48 ± 3,31 | +26,64 | 4,36 ± 0,46 | +20,44 | 1,46 ± 0,30 | + 5,80 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 15,74 ± 4,68 | +28,49 | 4,56 ± 0,85 | +25,97 | 1,67 ± 0,23 | +21,01 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$ g/ml) | 12,02 ± 2,75 | - 1,88 | 2,70 ± 0,68 | -25,41 | 0,77 ± 0,19 | -44,20 |

* $P<0,05$

Tabelle 10: Die Veränderung des ATP-, ADP- und AMP-Gehalts ruhender unbelasteter Herzvorhöfe im Anoxietest und ihre Beeinflussung durch Substrate der Adeninnucleotidsynthese und durch verschiedene cardiotone Pharmaka.

$\Delta$% = - 19,22%). Die unter 3.2.3.2. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und cardiotone Pharmaka verursachten keine signifikante Veränderung des Adeninnucleotidpools im Vergleich zur $N_2$-Kontrolle. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

| Zusatz | Adeninnucleotidpool n Mol/mg Protein | $\Delta$ % | P | n |
|---|---|---|---|---|
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 21,33 ± 2,23 | +23,79 | 0,3>P>0,4 | 5 |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 17,23 ± 3,34 | | | 5 |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 17,52 ± 5,29 | + 1,68 | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 20,36 ± 2,85 | +18,17 | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 15,74 ± 5,76 | - 8,64 | P>0,95 | 5 |
| $N_2$-Adenin(0,1mM) +Ribose(15mM) | 22,01 ± 4,65 | +27,74 | P>0,3 | 5 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 21,30 ± 3,41 | +23,62 | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 21,96 ± 8,49 | +27,45 | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$ g/ml) | 15,48 ± 3,09 | -10,16 | P>0,95 | 5 |

Tabelle 11: Zusammenstellung des Adeninnucleotidpools ruhender unbelasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie und Anoxie bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka. Die Werte sind in n Mol/mg Protein angegeben; Signifikanzen wurden in Bezug auf die $N_2$-Kontrolle berechnet.

3.2.3.2.1.5. CP (Tab. 12).

a.) Normoxie

Die CP-Konzentration im Gewebe beträgt nach 2 Stunden Normoxie 38,39 ± 4,72 n Mol/mg Protein.

b.) Anoxie

Vergleichbar mit vorausgegangenen Untersuchungen konnte unter Anoxie ein signifikanter ($P<0,001$; $n=5$) Unterschied der CP-Konzentration im Vergleich zur Normoxie beobachtet werden. Nach 2 Stunden Anoxie wird ein Wert von $7,46 \pm 2,53$ n Mol/mg Protein beobachtet. Dieser Wert beträgt 19,43% des normoxischen Kontrollwertes. Die unter 3.2.3.2. genannten Zusätze zur Nährlösung verursachten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den anoxischen Kontrollwerten.

3.2.3.2.1.6. CR (Tab.12).

a.) Normoxie

Nach 2 Stunden Normoxie fanden wir eine CR-Konzentration von $21,97 \pm 3,26$ n Mol/mg Protein die mit den Werten aus Abb.32 (schlagende Herzvorhöfe) übereinstimmt.

b.) Anoxie

Da in diesem Versuch nur die Endwerte bestimmt wurden, ist der Spitzenwert am Anfang der Anoxie nicht sichtbar. Nach 2 Stunden Anoxie fanden wir eine signifikant höhere CR-Konzentration ($P<0,02$; $n=5$; $\Delta\% = +233,50\%$) Zugabe der unter 3.2.3.2. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und verschiedener cardiotoner Pharmaka bewirkten keine signifikanten Unterschiede der CR-Konzentration im Gewebe. Die Ergebnisse liegen in der Streubreite.

| | Creatinphosphat | | Creatin | |
|---|---|---|---|---|
| | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % |
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 38,39±4,72 | *** | 21,97±3,26 | |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 7,46±2,35 | | 51,30±8,79 | |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 8,03±1,90 | + 7,46 | 54,33±3,97 | + 5,91 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 5,74±0,94 | -23,06 | 58,84±8,63 | +14,70 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 5,13±0,33 | -31,23 | 63,81±4,82 | +24,39 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) +Ribose(15mM) | 4,08±0,92 | -45,31 | 55,88±5,20 | + 8,93 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 4,17±1,05 | -44,10 | 54,36±8,35 | + 5,96 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 9,61±1,91 | +28,82 | 61,13±9,32 | +19,16 |
| $N_2$-g-Strophanthin($2x10^{-7}$ g/ml) | 9,29±1,94 | +24,53 | 66,15±5,60 | +28,95 |

*** P<0,001

Tabelle 12: Zusammenstellung der CP- und CR-Konzentration ruhender unbelasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie und Anoxie bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka. Die Werte sind in n Mol/mg Protein angegeben.

3.2.3.2.1.7. Creatinpool (CP + CR) (Tab.13)

a.) Normoxie

Der Creatinpool im Gewebe beträgt 60,36 ± 4,40 n Mol/mg Protein zum Zeitpunkt 3. Auch dieser Wert stimmt mit den schlagenden Herzvorhöfen aus Abbildung 32 überein.

| Zusatz | Creatinpool in n Mol/mg Protein | △ % | P | n |
|---|---|---|---|---|
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 60,36 ± 4,40 | + 2,72 | P>0,8 | 5 |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 58,76 ± 9,86 | | | 5 |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 62,36 ± 4,55 | + 6,12 | P>0,7 | 5 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 64,75 ± 8,28 | + 9,88 | P>0,6 | 5 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 68,94 ± 4,89 | +17,32 | P>0,3 | 5 |
| $N_2$-Adenin(0,1mM) +Ribose (15mM) | 59,96 ± 5,69 | + 2,04 | P>0,3 | 5 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 58,53 ± 7,87 | - 0,39 | P>0,98 | 5 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-2}$M) | 70,74 ± 9,96 | +20,38 | P>0,4 | 5 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$ g/ml) | 75,44 ± 4,71 | +28,39 | P>0,1 | 5 |

Tabelle 13: Zusammenstellung des Creatinpools ruhender unbelasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie und Anoxie bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka. Die Werte sind in n Mol/mg Protein angegeben; Signifikanzen wurden in Bezug auf die $N_2$-Kontrolle berechnet.

b.) Anoxie

Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle ist zum Zeitpunkt 3 der Creatinpool mit 58,76 ± 9,86 n Mol/mg Protein nicht signifikant verschieden ($P<0,8$; $n=5$ △ % = - 2,65% bezogen auf den Wert unter Normoxie).

Die unter 3.2.3.2. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und cardiotone Pharmaka verursachten keine signifikante Veränderung des Creatinpools im Vergleich zur $N_2$-Kontrolle.

3.2.3.2.2. Untersuchungen an elektrisch gereizten, belasteten Herzvorhöfen (Tab. 13-18).

Die Herzvorhöfe der Versuchsreihe aus Abb.27, 28/I, 28/II und aus Kapitel 3.2.2.3.2. wurden zum Zeitpunkt 3 (=Meßpunkt 4) aus der Versuchskammer entnommen und aufgearbeitet (2.2.2.1.). Die dargestellten Werte stellen damit Endwerte nach 2 Stunden Normoxie bzw. Anoxie dar, wobei die jeweilige Einwirkung der entsprechenden Substanz während der letzten Stunde Normoxie bzw. Anoxie vor Fixierung des Herzvorhofes erfolgte.

Die folgenden Substanzen wurden zugefügt:

I.) unter Normoxie

a.) Ohne Zusatz, jedoch mit 15 mM Glukose im Nährmedium (=$O_2$-Kontrolle)

b.) Adenin, 0,1 mM

c.) Adenin 0,1 mM + Ribose 15 mM

d.) Creatin, 1 mM

II.) unter Anoxie

e.) Ohne Zusatz, jedoch mit 15 mM Glukose im Nährmedium (=$N_2$-Kontrolle)

f.) Glukose, Erhöhung der Glukosekonzentration von 15 mM auf 30 mM Endkonzentration

g.) Creatin, 1 mM

h.) Adenin, 0,1 mM

i.) Ribose, 15 mM

j.) Adenin 0,1 mM + Ribose 15 mM

k.) Nicotinsäureamid, 20 mM

l.) Theophyllin, $1x10^{-5}$ M

m.) g-Strophanthin, $2x10^{-7}$ g/ml

3.2.3.2.2.1. ATP

a.) Normoxie (Tab.15)

Aus Tabelle 14 wird deutlich, daß die ATP-Konzentration im Gewebe nach 2 Stunden Normoxie 16,40 ± 1,25 n Mol/mg Protein beträgt.

Zusatz von 0,1 mM Adenin und 1 mM Creatin beeinflußte den ATP-Gehalt im Gewebe nicht signifikant auf 19,01 ± 0,80 ($\Delta$% =+15.91%) bzw. 19,04 ± 1,20 ($\Delta$% =+16,09%) n Mol/mg Protein. Eine signifikante Zunahme der ATP-Konzentration konnte dagegen auf 24,42 ± 2,98 n Mol/mg Protein bei Zusatz von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose beobachtet werden ($P<0,05$; n=5; $\Delta$% =+50,06%)

b.) Anoxie (Tab.14)

Vergleichbar mit den vorrausgegangenen Ergebnissen fanden wir während 2 Stunden Anoxie einen signifikanten Abfall der ATP-Konzentration auf 70,55% des normoxischen Kontrollwertes ($P<0,01$; n=5; = 11,57 ± 0,67 n Mol/mg Protein). Zusatz der unter 3.2.3.2.2. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka zeigte nach Zusatz von 0,1 mM Adenin eine signifikant höhere ATP-Konzentration ($P<0,05$; n=5; $\Delta$% = + 71,91%) von 19,89 ± 3,22 n Mol/mg Protein. Auch nach Zusatz der Kombination von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose ist die ATP-Konzentration noch signifikant erhöht (= 16,78 ± 2,38 n Mol/mg Protein, $P<0,05$; n=5; $\Delta$% = + 45,03%). Alle anderen Zusätze verursachten keine signifikante Veränderung der ATP-Konzentration im Vergleich zu anoxischen Kontrolle. Die

Werte lagen im Bereich der Streubreite.

3.2.3.2.2.2. ADP

a.) Normoxie (Tab. 15.)

Die ADP-Konzentration im Gewebe beträgt nach 2 Stunden Normoxie 4,51 ± 0,76 n Mol/mg Protein.

Zusatz von 0,1 mM Adenin und 1 mM Creatin reduzierte die ADP-Konzentration andeutungsweise auf 3,82 ± 0,21 ($\Delta\%$ = - 15,30%) bzw. 3,62 ± 0,22 ($\Delta\%$ = - 19,73%) ohne Signifikanz. Bei allen anderen Zusätzen lagen die Werte im Bereich der Streubreite.

b.) Anoxie (Tab. 14)

Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle bleibt der ADP-Gehalt im Gewebe unter Anoxie unverändert ( = 3,80 ± 0,32 n Mol/mg Protein $P>0,9$; n=5). Zusatz von 0,1 mM Adenin im Anoxietest zeigt eine signifikante Zunahme der ADP-Konzentration auf 6,51 ± 0,80 n Mol/mg Protein ($P<0,01$; n=5; $\Delta\%$ = + 71,32%).

Bei allen anderen Zusätzen konnten die Veränderungen der ADP-Konzentration im Gewebe nicht statistisch gesichert werden.

3.2.3.2.2.3. AMP

a.) Normoxie (Tab.15)

Die AMP-Konzentration im Gewebe beträgt nach 2 Stunden Normoxie 1,06 ± 0,23 n Mol/mg Protein. Bei allen Zusätzen lagen die Werte im Bereich der Streubreite der normoxischen

| Anoxie | ATP | | ADP | | AMP | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % | n Mol/mg Protein | Δ % | m Mol/mg Protein | Δ % |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 11,57 ± 0,67 | | 3,80 ± 0,32 | | 1,37 ± 0,41 | |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 9,26 ± 2,23 | -19,97 | 3,66 ± 1,38 | - 3,68 | 0,95 ± 0,41 | -30,66 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 19,89 ± 3,22 | +71,91* | 6,51 ± 0,80 | +71,32** | 1,54 ± 0,30 | +12,41 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 10,13 ± 2,90 | -12,45 | 3,27 ± 0,38 | -13,95 | 0,78 ± 0,27 | -43,07 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) +Ribose (15mM) | 16,78 ± 0,38 | +45,03* | 5,99 ± 1,92 | +57,63 | 1,63 ± 0,41 | -18,98 |
| $N_2$-Creatin (1mM) | 14,20 ± 1,01 | +22,73 | 4,21 ± 0,92 | +10,79 | 1,03 ± 0,42 | +24,82 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 11,76 ± 3,36 | + 1,64 | 5,88 ± 1,78 | +54,74 | 2,50 ± 0,34 | +82,48 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 8,22 ± 2,36 | -28,95 | 2,92 ± 0,82 | -39,74 | 2,35 ± 0,82 | +71,53 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 9,98 ± 1,60 | -13,74 | 3,88 ± 0,94 | + 2,11 | 0,64 ± 0,32 | -53,28 |

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

Tabelle 14: Die Veränderung des ATP-, ADP- und AMP-Gehalts schlagender belasteter Herzvorhöfe im Anoxietest und ihre Beeinflußung durch Substrate der Adeninnucleotidsynthese und durch verschiedene cardiotone Pharmaka.

| Normoxie | ATP | | ADP | | AMP | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % | Konzentration n Mol/mg Protein | Δ % |
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 16,40 ± 1,25 | | 4,51 ± 0,76 | | 1,06 ± 0,23 | |
| $O_2$-Adenin (0,1 mM) | 19,01 ± 0,80 | +15,91 | 3,82 ± 0,21 | -15,30 | 0,97 ± 0,20 | - 8,49 |
| $O_2$-Adenin (0,1mM) +Ribose (15mM) | 24,42 ± 2,98 | +50,06* | 4,29 ± 0,43 | - 4,88 | 0,93 ± 0,07 | -12,26 |
| $O_2$-Creatin (1mM) | 19,04 ± 1,20 | +16,01 | 3,62 ± 0,22 | -19,73 | 0,77 ± 0,09 | -27,36 |

* $P<0,05$

Tabelle 15: Die Veränderung des ATP-, ADP- und AMP-Gehalts schlagender belasteter Herzvorhöfe unter Normoxie und die Beeinflussung durch Substrate der Adeninnucleotidsynthese.

Kontrolle.

b.) Anoxie (Tab.14)

Gegenüber der normoxischen Kontrolle ist die AMP-Konzentration unter Anoxie im Anoxietest (= 1,37 ± 0,41 n Mol/mg Protein) nicht signifikant verschieden ($P>0.5$; n=5). Bei Zusatz von 15 mM Ribose erscheint die AMP-Konzentration verringert (0,78 ± 0,27 n Mol/mg Protein). Dieser Wert konnte statistisch jedoch nicht gesichert werden ($P>0,2$; n=5; $\Delta\%$ = - 43,07%). Ebenso erscheint der Wert bei Inkubation mit 20 mM Ribose erhöht auf 2,50 ± 0,34 n Mol/mg Protein, jedoch konnte dieses Ergebnis nicht statistisch gesichert werden ($P>0,05$; n=5; $\Delta\%$ = + 82,48%). Bei allen anderen Zusätzen zur Nährlösung lagen die Werte im Bereich der Streubreite ohne Signifikanz.

3.2.3.2.2.4. Adeninnucleotidpool (ATP + ADP + AMP) (Tab.16)

a.) Normoxie

Der Adeninnucleotidpool im Gewebe beträgt nach 2 Stunden Normoxie 21,33 ± 2,33 n Mol/mg Protein.

Zusatz von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose zum Nährmedium steigerte den Adeninnucleotidpool unter Normoxie signifikant auf 29,64 ± 2,39 n Mol/mg Protein ($P<0,005$; n=5; $\Delta\%$ = + 34,85%). Alle anderen Zusätze zum Nährmedium verursachten keine signifikante Veränderung des Adeninnucleotidpools, die Werte lagen im Bereich der Streubreite der normoxischen Kontrollen.

Anoxie:

| Zusatz | Adeninnucleotidpool n Mol/mg Protein | Δ % | P | n |
|---|---|---|---|---|
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 16,74 ± 0,56 | | | 5 |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 13,88 ± 3,51 | -17,08% | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 27,87 ± 2,97 | +66,49% | P<0,01 | 5 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 16,94 ± 2,96 | + 1,19% | P>0,5 | 5 |
| $N_2$-Adenin(0,1mM) +Ribose(15mM) | 28,67 ± 1,60 | +71,27% | P<0,001 | 5 |
| $N_2$-Creatin (1mM) | 19,40 ± 1,60 | +15,89% | P>0.8 | 5 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 23,29 ± 4,42 | +39,13% | P>0,1 | 5 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-3}$M) | 13,49 ± 3,44 | -19,42% | P>0,3 | 5 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 14,51 ± 2,26 | -13,32% | P>0,3 | 5 |

Normoxie:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 21,98 ± 1,90 | Δ % | P | 5 |
| $O_2$-Adenin (0,1mM) | 23,80 ± 1,20 | + 8,28% | P>0,8 | 5 |
| $O_2$-Adenin (0,1mM) +Ribose (15mM) | 29,64 ± 2,39 | +34,85% | P<0,05 | 5 |
| $O_2$-Creatin (1mM) | 23,43 ± 1,12 | + 6,59% | P>0,9 | 5 |

Tabelle 16: Zusammenstellung des Adeninnucleotidpools schlagender belasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie und Anoxie bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka. Die Werte sind in n Mol/mg Protein angegeben; Signifikanzen wurden in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen berechnet.

b.) Anoxie

Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle ist der Adeninnucleotidpool mit 16,74 ± 0,56 n Mol/mg Protein nicht signifikant verschieden (0,3<P<0,4; n=5; Δ% = 76,16% bezo-

gen auf den Wert unter Normoxie).

Zusatz von 0,1 mM Adenin erhöhte den Adeninnucleotidpool signifikant im Vergleich zur anoxischen Kontrolle auf 27,87 ± 2,97 n Mol/mg Protein ($P<0,01$; $n=5$; $\Delta\% = +66,49\%$), ebenso ist der Adeninnucleotidpool signifikant erhöht auf 28,67 ± 1,60 n Mol/mg Protein durch die Kombination von 0,1 mM 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose ($P<0,001$; $n=5$; $\Delta\% = +71,27\%$). Alle anderen Zusätze zur Nährlösung veränderten den Adeninnucleotidpool nicht signifikant. Die Werte waren im Bereich der anoxischen Kontrolle. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 zusammengefaßt.

3.2.3.2.2.5. CP (Tab.17)

a.) Normoxie

Die CP-Konzentration im Gewebe beträgt zum Zeitpunkt 3 unter Normoxie 34,52 ± 5,49 n Mol/mg Protein.
Bei Inkubation mit 0,1 mM Adenin wie auch 1 mM Creatin erscheint die CP-Konzentration um 23,41% bzw. 23,35% erhöht, jedoch konnte dieser Unterschied nicht statistisch gesichert werden (in beiden Fällen $P>0,8$; $n=5$).

b.) Anoxie

Vergleichbar mit vorausgegangenen Untersuchungen konnte unter 2 Stunden Anoxie ein signifikanter Abfall ($P<0,001$; $n=5$) der CP-Konzentration auf 6,62 ± 0,36 n Mol/mg Protein (= 19,18% des normoxischen Kontrollwertes) beobachtet werden.
Bei Zusatz von 0,1 mM Adenin zum Nährmedium konnten wir

unter Anoxie einen signifikant geringeren Abfall der CP-Konzentration auf 9,67 ± 0.64 n Mol/mg Protein (= 28,01% des normoxischen Kontrollwertes) beobachten ($P<0,005$; n=5). Auffallend ist, daß bei einer Inkubation mit 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose wie auch mit 20 mM Nicotinsäureamid die CP-Konzentration im Vergleich zur anoxischen Kontrolle stärker abfiel; bei 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose auf 2,75 ± 1,24 n Mol/mg Protein (= 7,97% des normoxischen Kontrollwertes; $P<0,1$; n=5) und bei 20 mM Nicotinsäureamid auf 3,65 ± 1,14 n Mol/mg Protein (= 10,57% des normoxischen Kontrollwertes; $P<0,05$; n=5). Durch Zusatz von $2x10^{-7}$ g/ml g-Strophanthin erscheint der Abfall der CP-Konzentration auf 9,43 ± 2,39 n Mol/mg Protein (= 27,13% des normoxischen Kontrollwertes) verringert, vergleichbar mit den Ergebnissen bei Inkubation mit 0,1 mM Adenin, jedoch bedingt durch die große Streubreite konnte dieser Wert nicht statistisch gesichert werden.
Alle anderen unter 3.2.3.2.2. genannten Zusätze zum Nährmedium verursachten keine signifikante Veränderung der CP-Konzentration.

3.2.3.2.2.6. CR (Tab.17)

a.) Normoxie
Nach 2 Stunden Normoxie fanden wir eine CR-Konzentration von 26,55 ± 5,21 n Mol/mg Protein. Die unter 3.2.3.2.2. genannten Zusätze zur Nährlösung verursachten keine Veränderung der CR-Konzentration. Die Werte lagen im Bereich der Streubreite.

| Anoxie | Creatinphosphat | | Creatin | |
|---|---|---|---|---|
| | Konzentration n Mol/mg Protein | △ % | Konzentration n Mol/mg Protein | △ % |
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 6,62 ± 0,36 | | 55,06 ± 5,62 | |
| $N_2$-Glukose (30mM) | 7,64 ± 1,75 | +15,41 | 60,14 ± 3,60 | + 9,23 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 9,67 ± 0,64 | +46,07** | 52,93 ± 5,27 | - 3,87 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 6,94 ± 1,65 | + 4,83 | 56,72 ± 5,86 | + 3,02 |
| $N_2$-Adenin(0,1mM) +Ribose(15mM) | 2,75 ± 1,24 | -58,46* | 59,15 ± 5,06 | + 7,43 |
| $N_2$-Creatin (1mM) | 8,27 ± 1,12 | +24,92 | 57,97 ± 6,6 | + 5,29 |
| $N_2$-Nicotinsäure-amid (20mM) | 3,65 ± 1,14 | -44,86* | 61,57 ± 6,76 | +11,82 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-3}$M) | 5,39 ± 1,90 | -18,58 | 65,66 ± 6,02 | +19,25 |
| $N_2$-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 9,43 ± 2,39 | +42,44 | 51,75 ±11,87 | - 6,02 |
| **Normoxie** | **Creatinphosphat** | | **Creatin** | |
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 34,52 ± 5,49 | | 26,55 ± 5,21 | |
| $O_2$-Adenin (0,1mM) | 42,73 ± 4,39 | +23,78 | 14,58 ± 1,29 | -45,08 |
| $O_2$-Adenin(0,1mM) +Ribose(15mM) | 30,78 ± 3,11 | -10,83 | 24,13 ± 2,0 | - 9,11 |
| $O_2$-Creatin (1mM) | 42,58 ± 3,50 | +23,35 | 22,76 ± 1,83 | -14,27 |

* P<0,05
** P<0,01

Tabelle 17: Zusammenstellung der CP- und CR-Konzentration schlagender belasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie und Anoxie bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka. Die Werte sind in n Mol/mg Protein angegeben.

b.) Anoxie

Da auch in diesem Versuch nur die Endwerte zum Meßpunkt 4 bestimmt wurden, ist der Spitzenwert am Anfang der Anoxie

nicht sichtbar (vgl. Abb.32). Nach 2 Stunden Anoxie beobachteten wir eine signifikant höhere CR-Konzentration von 55,06 ± 5,62 n Mol/mg Protein ($P<0,01$; $n=5$; $\Delta\% = +107,38\%$). Zugabe der unter 3.2.3.2.2. genannten Substrate der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka bewirkten keine signifikante Veränderung im Vergleich zur anoxischen Kontrolle. Die Ergebnisse lagen in der Streubreite.

3.2.3.2.2.7. Creatinpool (CP + CR) Tab. 18).

a.) Normoxie

Der Creatinpool im Gewebe beträgt 60,40 ± 14,40 n Mol/mg Protein zum Zeitpunkt 3.

b.) Anoxie

Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle ist der Creatinpool zum Zeitpunkt 3 mit 61,68 ± 5,45 n Mol/mg Protein nicht signifikant verschieden ($P>0,8$; $n=5$; $\Delta\% = + 2,11\%$.

Die unter 3.2.3.2.2. genannten Substrate der Adeninucleotidsynthese und cardiotone Pharmaka verursachten keine signifikante Veränderung des Creatinpools im Vergleich zur anoxischen Kontrolle. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Anoxie:

| Zusatz | Creatinpool n Mol/mg Protein | Δ % | P | n |
|---|---|---|---|---|
| $N_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 61,68 ± 5,45 | | | |
| $N_2$-Glukose (30mM Endkonz.) | 69,34 ± 3,81 | +12,42% | P>0,3 | 5 |
| $N_2$-Adenin (0,1mM) | 62,70 ± 4,39 | + 1,65% | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-Ribose (15mM) | 68,17 ± 4,04 | +10,52% | P>0,4 | 5 |
| $N_2$-Adenin(0,1mM) +Ribose(15mM) | 61,90 ± 5,50 | + 0,36% | P>0,98 | 5 |
| $N_2$-Creatin (1mM) | 62,63 ± 3,42 | + 1,54% | P>0,9 | 5 |
| $N_2$-Nicotinsäureamid (20mM) | 67,87 ± 6,62 | +10,03% | P>0,4 | 5 |
| $N_2$-Theophyllin ($1x10^{-5}$M) | 71,04 ± 5,02 | +15,18% | P>0,3 | 5 |
| $N_2$-g-Strophanthin ($2x10^{-7}$g/ml) | 63,04 ± 9,84 | + 2,20% | P>0,9 | 5 |

Normoxie:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $O_2$-Kontrolle (15mM Glukose) | 60,40 ± 15,40 | | | 5 |
| $O_2$-Adenin (0,1 mM) | 65,49 ± 11,60 | + 8,41% | P>0,3 | 5 |
| $O_2$-Adenin 0,1 mM +Ribose 15 mM | 54,80 ± 9,57 | - 9,72% | P>0,4 | 5 |
| $O_2$-Creatin (1mM) | 65,60 ± 10,39 | + 8,60% | P>0,4 | 5 |

Tabelle 18: Zusammenstellung des Creatinpools schlagender belasteter Meerschweinchenherzvorhöfe unter Normoxie und Anoxie bei Zusatz von Substraten der Adeninnucleotidsynthese und cardiotoner Pharmaka. Die Werte sind in n Mol/mg Protein angegeben; Signifikanzen wurden in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen berechnet.

3.2.4. Der Sauerstoffverbrauch von ruhenden und schlagenden Herzvorhöfen bei 35°C (Abb. 33 bis 36).

An insgesamt 4 Herzvorhöfen wurden bei 35°C der Ruhesauerstoffverbrauch gemessen. Er betrug im Mittel 4,61 ± 0,14 µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht. Danach wurde, wie aus Abb. 33 hervorgeht, stufenweise die Schlagfrequenz in Intervallen von 0,5 Hz gesteigert bis auf 4,5 Hz, wobei mit zunehmender Frequenz eine deutliche Zunahme der Kontraktionskraft auftrat (Frequenzinotropie).

Es wurde dabei immer das Maximum der inotropen Wirkung gemessen, welches wenige Minuten nach Einschalten der neuen Frequenz erreicht war. Das Einstellen des Sauerstoffgleichgewichtes trat sehr rasch nach Eintreten des Maximums der inotropen Wirkung ein. Die zweite Phase, in welcher die Kontraktionskraft langsam abfiel, wurde in diesen Versuchen nicht abgewartet, um Ermüdungseffekte möglichst auszuschalten. Interessant ist, daß das Gleichgewicht des Sauerstoffverbrauches in erster Linie von der Frequenz bestimmt wird, während geringe Änderungen der Inotropie sich naturgemäß im unteren Frequenzbereich weniger, im oberen Frequenzbereich mehr bemerkbar machen. Es wurden in diesen Versuchen kein mechanisches "steady state" abgewartet, sondern sofort nach Erreichen des Sauerstoffgleichgewichtes, welches dicht hinter dem Maximum der Frequenzinotropie lag, auf die nächste Frequenz umgeschaltet.

Aus Abb.33 geht sehr deutlich hervor, daß das Maximum der inotropen Wirkung bei 1,5 Hz bis 2,0 Hz erreicht wird.

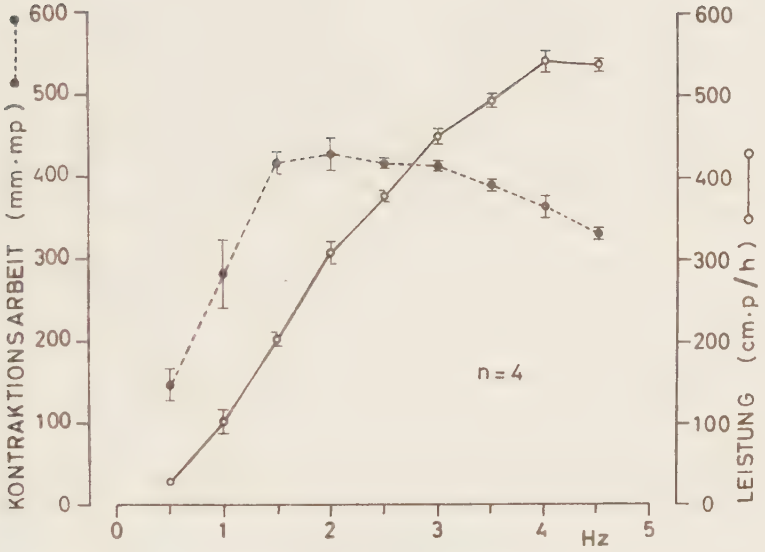



Abb.33: Veränderungen der Kontraktionsarbeit/Schlag ($A_s$) •----• und der Leistung ($A_h$) o——o linker elektrisch gereizter Meerschweinchenherzvorhöfe bei 35°C in Abhängigkeit von der Frequenz. Die dargestellten Werte sind Maximalwerte, die kurz nach dem Umschalten auf die nächst höhere Frequenz erreicht wurden.

Erhöhung der Frequenz führte ab 3 Hz wieder zu einer sehr deutlichen Abnahme des Plateaus, d.h. zu ausgeprägter negativ inotroper Wirkung. Die Beziehung zwischen Kontraktionskraft/Schlag ($A_s$) und der Frequenz ist nur zwischen 0,5 und 1,5 Hz annähernd linear. Bei hohen Frequenzen wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft/Schlag ($A_s$) beobachtet.

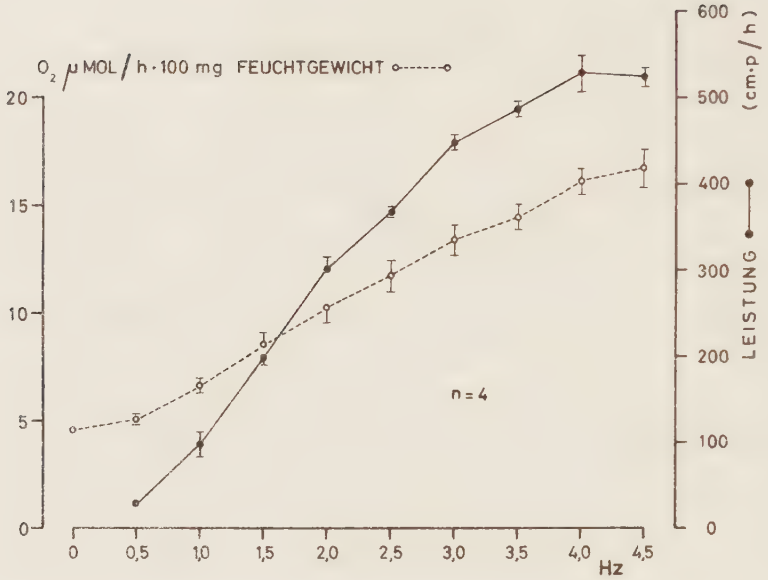



Abb.34: Veränderungen der Leistung ($A_h$) ●——● und des Gesamtsauerstoffverbrauches o----o linker elektrisch gereizter Meerschweinchenherzvorhöfe in Abhängigkeit von der Frequenz bei 35°C.

Die Leistung (Kontraktionskraft/Stunde = $A_h$) steigt zwischen 1,0 und 2,0 Hz annähernd linear an, um dann bei höheren Frequenzen entsprechend der negativ inotropen Wirkung immer flacher zu werden. Zwischen 4,0 und 4,5 Hz steigt $A_h$ nicht mehr an, da die Frequenzsteigerung durch die negative Inotropie ausgeglichen wird.

Beobachtet man nun den mittleren Sauerstoffverbrauch in µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht (Abb.35), so ergibt sich eine fast lineare Beziehung zwischen Ruhesauerstoffver-

brauch und Leistung ($A_h$) bis zu ca. 300 cm x p/h (entspricht etwa 2,0 Hz), dann biegt die Kurve nach oben ab bis ca. 500 cm x p/h. Als Folge weiteter Frequenzsteigerung, die durch die negativ inotrope Wirkung aber keine weitere Leistungszunahme ( $A_h$) hervorruft, wird noch mehr Sauerstoff benötigt. Das Verhältnis zwischen Leistung und Sauerstoffverbrauch wird unökonomischer.

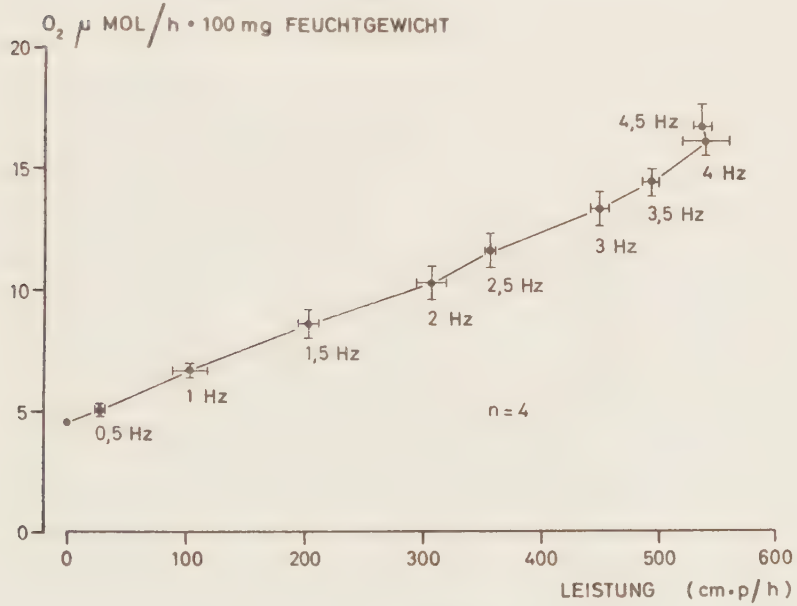



Abb.35: Gesamtsauerstoffverbrauch linker elektrisch gereizter Meerschweinchenherzvorhöfe bei 35°C in Abhängigkeit von der Leistung bei verschiedenen Frequenzen.

Betrachtet man nun den Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Frequenz (Abb.34), so zeigt sich eine eben-

falls fast lineare Beziehung. Aus Abb.33 und Abb.34 ergibt sich sehr deutlich, daß die im Frequenzbereich von 0,5 bis 2,0 Hz eintretende sehr starke positiv inotrope Wirkung der Kontraktionsarbeit/Schlag ($A_s$) (149,85 $\pm$ 20,98 bis 413,0 $\pm$ 5,23 mm x mp) offensichtlich sich zunächst weniger im Gesamtsauerstoffverbrauch bemerkbar macht. Betrachtet man nun in Abb.36 den Bruttonutzeffekt der sich aus Leistung/Gesamtsauerstoffverbrauch einschließlich des Ruhesauerstoffverbrauches ergibt, so findet man bei einer Frequenz von 0,5 Hz entsprechend der niederen Leistung einen niederen Bruttonutzeffekt, der mit zunehmender Frequenz im Bereich der positiven inotropen Wirkung ansteigt und sein Maximum in einem Plateau zwischen 2,5 und 4,0 Hz erreicht, um dann wieder bei höheren Frequenzen über 5,0 Hz abzusinken.

Etwas anders ist das Bild, wenn man die Leistung in den einzelnen Frequenzen unter Abzug des Ruhesauerstoffverbrauches (Nettonutzeffekt) nur auf den für die Kontraktionsarbeit benötigten Mehrverbrauch bezieht. Hier ergibt sich nun, daß die, zwischen 0,5 und 2,0 Hz, pro $\mu$ Mol Sauerstoff geleistete Arbeit, bei der relativ großen Streuung keine signifikanten Änderungen aufweist. Sie zeigt sehr wohl eine Tendenz, zwischen 1,0 und 2,0 Hz etwas anzusteigen. Auffallend ist aber, daß ab einer Frequenz von 2,0 Hz ein fast linearer Abfall des Nettonutzeffektes der Kontraktionsarbeit erfolgt, d.h. pro $\mu$ Mol Sauerstoffverbrauch wird bei höheren Frequenzen immer weniger Kontraktionsarbeit hervorgebracht, oder

Mehrleistung durch Frequenzsteigerung bei gleichzeitiger negativen Inotropie erfordert mehr Sauerstoff, ist also weniger ökonomisch.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt um für die spätere Berechnung der Energiebilanz unter Normoxie und Anoxie Vergleiche ziehen zu können. Die Kontraktionskraft/Schlag ($A_s$) bei einer Frequenz von 0,5 Hz beträgt rund 35% des Kontraktionsmaximums bei einer Frequenz von 1,5 Hz. Dieser Wert ist etwas höher als in den anderen Versuchsserien, bedingt dadurch, daß hier an dem Kontraktionsmaximum gemessen wurde, und die Ermüdung nicht mit in die Berechnung eingeht.

Der Sauerstoffmehrverbrauch bei einer Frequenz von 0,5 Hz ist gegenüber dem Ruhesauerstoffverbrauch gering ($\Delta\%$ = + 10,61%). Dieser Mehrverbrauch entspricht aber im Nettonutzeffekt (Leistung $A_h/\mu$ Mol $O_2$ Gesamt - $O_2$ Ruhe /h x 100 mg Feuchtgewicht) beinahe den Werten die bei einer Frequenz von 2,0 Hz beobachtet wurden. Betrachtet man aber die Leistung unter Einschluß des Ruhesauerstoffverbrauches (= Bruttonutzeffekt), so ist bei einer Frequenz von 0,5 Hz ganz eindeutig der Bruttonutzeffekt bei der geleisteten Arbeit ganz beträchtlich niedriger als bei hoher Frequenz.

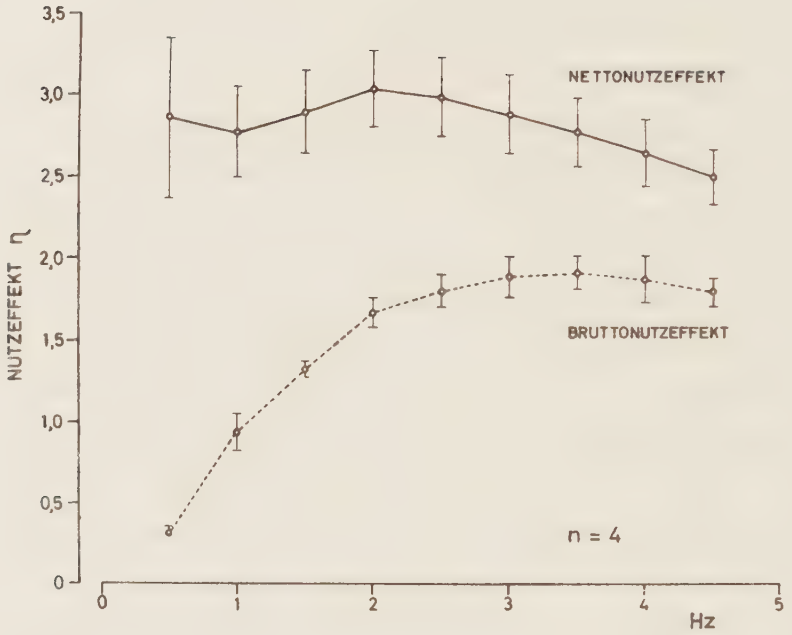



Abb.36: Die Veränderungen des Bruttonutzeffektes (Leistung $A_h$/Gesamtsauerstoffverbrauch) und des Nettonutzeffektes (Leistung $A_h$/Gesamtsauerstoffverbrauch - Ruhesauerstoffverbrauch) linker elektrisch gereizter Meerschweinchenherzvorhöfe bei ansteigender Frequenz und 35°C.

3.2.4.1. Berechnung der ATP-Bildung aus der aeroben Glukoseoxidation und der anaeroben Glykolyse.

a.) 1 Mol Glukose + 2 ATP ---→ 2 Mol Laktat + 4 ATP

ATP - Gewinn = 2 Mol ATP / 1 Mol Glukose

b.) 1 Mol Glykogen-Glukose + 3 Mol ADP + 3 Mol Pi + 1 Mol ATP ---→ 2 Mol Laktat + 4 Mol ATP

ATP - Gewinn = 3 Mol ATP / 1 Mol Glykogen-Glukose

(Pi = anorganisches Phosphat)

Laut Itzel (Dissertation 1969) enthalten 100 mg Herzvorhof (Feuchtgewicht) etwa 4 µ Mol Glykogen. Bei unseren Versuchen hatten wir ein mittleres Vorhoffeuchtgewicht von 33,01 ± 0,6 mg, sodaß in jedem Präparat etwa 0,75 µ Mol Glykogen enthalten sind. Unter der Annahme, daß in der zweiten Stunde Anoxie (zwischen MP 3 und MP 4) der Glykogenvorrat des Herzmuskels annähernd verbraucht ist, kann die Produktion von ATP aus Glykogen mit der Bildung von Laktat vernachlässigt werden.

3.2.4.2. Energiebilanz

3.2.4.2.1. Unbelastete ruhende Herzvorhöfe bei 35°C und Anwesenheit von 15 mM Glukose im Nährmedium.

Der Sauerstsffverbrauch von linken ruhenden Herzvorhöfen bei einer Versuchstemperatur von 35°C beträgt 4,61 µ Mol/ h x 100 mg Feuchtgewicht (FG). Aus dem Sauerstoffverbrauch und der Laktatbildung kann die ATP-Bildung unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen wie folgt errechnet werden:

I AEROB:

A. Glukose oxidation:

1.) 4,61 µ Mol $O_2$-Verbrauch/h x 100 mg FG ÷ 6
≙ 0.768 µ Mol Glukose oxidiert/h x 100 mg FG

2.) 1 µ Mol Glukose oxidiert ≙ 38 µ Mol ATP gebildet

3.) 0,768 u Mol Glukose oxidiert = 29,184 µ Mol ATP gebildet/h x 100 mg FG

B. Aerobe Laktatbildung

Die aerobe Laktatbildung in der zweiten Stunde des Versuches beträgt: (708,24 - 451,79) = 256,45 n Mol Laktat/h x 33,01 mg FG

$= \frac{256,45 \times 100}{33,01}$ n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 776,88 n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 0,777 µ Mol Laktat/h x 100 mg FG

1 Mol gebildetes Laktat = 1 Mol ATP

0,777 µ Mol gebildetes Laktat = 0,777 µ Mol ATP/h x 100 mg FG.

Aus der Summe von A und B

ATP-Bildung = 29,184 + 0,777 = 29,952 µ Mol ATP/h x 100 mg FG.

II ANAEROB:

Anaerobe Laktatbildung:

In der zweiten Stunde des Anoxietestes zwischen MP3 und MP4 werden (4243,54 - 2124,64) = 2118,90 n Mol/h x 33,01 mg Vorhof gebildet

$= \frac{2118,90 \times 100}{33,01}$ n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 6418,96 n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 6,419 µ Mol ATP/h x 100 mg FG

III Quotient anaerob gebildetes ATP : aerob gebildetem ATP

$= \frac{6,419 \times 100}{29,952} = 21,43\%$

IV GLUKOSEVERBRAUCH:

A. Unter Normoxie wird:

1.) 0,768 µ Mol Glukose oxidiert

2.) $\frac{0,777}{2}$ = 0,3888 µ Mol Glukose als Laktat im Nährmedium angehäuft

Der Glukoseverbrauch/h x 100 mg FG beträgt also: 0,768 + 0,3888 = 1,155 µ Mol Glukose insgesamt. Hierbei geht nicht mit in Rechnung Glukose die als Glykogen gespeichert wird.

B. Unter Anoxie wird:

$\frac{6,419}{2}$ = 3,2095 µ Mol Glukose umgesetzt. Das Laktat stammt hierbei mit Sicherheit aus exogener Glukose, da das endogene Glykogen ab der zweiten bis dritten Stunde Anoxie nur noch in Spuren vorhanden ist.

C. Aus A und B folgt, daß der Glukoseverbrauch in der Anoxie um das 2,78 fache gesteigert ist (Pasteureffekt).

3.2.4.2.2. Elektrisch gereizte linke Herzvorhöfe bei 35°C und 0,5 Hz in Anwesenheit von 15 mM Glukose im Nährmedium.

Der Sauerstoffverbrauch von linken, elektrisch gereizten (0,5 Hz) Herzvorhöfen bei 35°C beträgt 5,10 ± 0,18 µ Mol /h x 100 mg Feuchtgewicht (FG). Aus dem Sauerstoffverbrauch und der Laktatbildung kann die ATP-Bildung unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen wie folgt

errechnet werden:

I AEROB

A. Glukose oxidation:

1.) 5,10 µ Mol $O_2$-Verbrauch/h x 100 mg FG ÷ 6
≙ 0,85 µ Mol Glukose oxidiert/h x 100 mg FG

2.) 1 µ Mol Glukose oxidiert ≙ 38 µ Mol ATP gebildet

3.) 0,85 µ Mol Glukose oxidiert ≙ 32,3 µ Mol ATP gebildet/h x 100 mg FG

B. Aerobe Laktatbildung:

Die aerobe Laktatbildung in der zweiten Stunde des Versuches beträgt: (787,82-543,10)=244,72 n Mol Laktat/h x 33,01 mg FG

$= \frac{244,72 \times 100}{33,01}$ n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 741,35 n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 0,7415 µ Mol Laktat/h x 100 mg FG

1 Mol gebildetes Laktat ≙ 1 Mol ATP

0,7415 u Mol gebildetes Laktat ≙ 0,7415 µ Mol ATP /h x 100 mg FG

C. Aus der Summe von A und B

ATP-Bildung = 32,3 + 0,7415 = 33,041 µ Mol ATP/h x 100 mg FG

II ANAEROB:

Anaerobe Laktatbildung:

In der zweiten Stunde des Anoxietestes zwischen MP 3 und MP 4 werden (9520,65 - 4270,49) = 5250,16 n Mol Laktat/h x Vorhof (= 33,01 mg FG) gebildet

$= \frac{5250,16 \times 100}{33,10}$ n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 15904,75 n Mol Laktat/h x 100 mg FG

= 15,904 µ Mol ATP/h x 100 mg FG

III Quotient anaerob gebildetes ATP : aerob gebildetem ATP

$= \frac{15,904 \times 100}{33,041} = 48,13\%$

Im ruhenden unbelasteten Herzvorhof betrug dieser Wert 24,43%

IV GLUKOSEVERBRAUCH:

Während der Kontraktionstätigkeit unter Normoxie wird:

a.) 0,85 µ Mol Glukose oxidiert

b.) $\frac{0,741}{2}$ = 0,37 µ Mol Glukose als Laktat im Nährmedium angehäuft

Der Glukoseverbrauch/h x 100 mg FG beträgt also:

0,85 + 0,37 = 1,22 µ Mol Glukose insgesamt

Während der Kontraktionstätigkeit unter Anoxie wird:

$\frac{15,094}{2}$ = 7,952 µ Mol Glukose/h x 100 mg FG zu Laktat umgesetzt.

Damit ist der Glukoseverbrauch im Herzvorhof in der Anaerobiose bei einer, gegenüber der Aerobiose um etwa 40% geringeren Leistung (60% des Ausgagswertes wird erreicht), um das $\frac{7,952}{1,22}$ = 6,52 fache gesteigert. Im Unterschied dazu ist an ruhenden unbelasteten Herzvorhöfen die Steigerung nur 2,78 fach.

| | ruhende, unbelastete Vorhöfe | schlagende, belastete Vorhöfe |
|---|---|---|
| A. Aerobe Glukoseoxidation | 0,768 µ Mol/h x 100 mg FG | 0,85 µ Mol/h x 100 mg FG |
| daraus berechnete ATP-Bildung | 29,19 µ Mol/h x 100 mg FG | 32,30 µ Mol/h x 100 mg FG |
| B. Aerobe Laktatbildung | 0,777 µ Mol/h x 100 mg FG | 0,742 µ Mol/h x 100 mg FG |
| daraus berechnete ATP-Bildung | 0,777 µ Mol/h x 100 mg FG | 0,742 µ Mol/h x 100 mg FG |
| C. Summe von A + B | 29,952µ Mol/h x 100 mg FG | 33,04 µ Mol/h x 100 mg FG |
| D. Anaerobe Laktatbildung | 6,419 µ Mol/h x 100 mg FG | 15,904µ Mol/h x 100 mg FG |
| daraus berechnete ATP-Bildung | 6,419 µ Mol/h x 100 mg FG | 15,904µ Mol/h x 100 mg FG |
| E. Quotient $\frac{\text{Anaerobes ATP}}{\text{Aerobes ATP}}$ | 21,43% | 48,13% |
| F. Aerober Glukoseverbrauch | 1,555 µ Mol/h x 100 mg FG | 1,22 µ Mol/h x 100 mg FG |
| G. Anaerober Glukoseverbrauch | 3,2095µ Mol/h x 100 mg FG | 7,952 µ Mol/h x 100 mg FG |
| H. Quotient $\frac{\text{Anaerober Glukoseverbrauch}}{\text{Aerober Glukoseverbrauch}}$ | 2,78 | 6,52 |

Tabelle 19: Tabellarische Aufstellung der ATP-Bildung aus der aeroben Glukoseoxidation und der anaeroben Glykolyse bei ruhenden, unbelasteten und schlagenden belasteten Herzvorhöfen unter Normoxie und Anoxie zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4.

3.2.4.2.3. Energiebilanz von ruhenden unbelasteten und schlagenden (0,5 Hz) belasteten (500 mp) Herzvorhöfen unter Normoxie und Anoxie mit Einbeziehung der Veränderung der energiereichen Phosphate zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4.

Die Energiebilanz der energiereichen Phosphate läßt sich nach folgender Gleichung darstellen:

ATP Bildung-ATP Verbrauch = $\Delta$ATP Gehalt ($\mu$ Mol/hx100 mg FG)

daraus folgt:

ATP Verbrauch = ATP Bildung - $\Delta$ ATP Gehalt ($\mu$Mol/hx100mg FG)

Nachdem die Bildung von CR+$P_i$---→ CP pro Mol 1 Mol ATP verbraucht, kann der Verlust von CP zu CR als energiereiches Phosphat mit dem Verlust von 1 Mol ATP gewertet werden. So ergibt sich bei Veränderungen der Konzentrationen im Gewebe folgende Energiebilanz:

ATP ---→ ADP = 1 energiereiches Phosphat

CP ---→ CR = 1 energiereiches Phosphat

$\Delta ATP_{MP3-MP4}$ = Verlust ($\Delta ATP_{MP3-MP4} + \Delta CR_{MP3-MP4}$)

3.2.4.2.3.1. Bei ruhenden unbelasteten Vorhöfen

$$\Delta ATP_{MP3-MP4} = \text{Verlust } (\Delta ATP_{MP3-MP4} + \Delta CR_{MP3-MP4})$$

$$= (2{,}19 - 2{,}13)$$

$$= 4{,}32 \text{ n Mol/mg Protein x h}$$

bei einem mittleren Proteingehalt von 3,747 mg/Herzvorhof ergibt sich dann:

$$\Delta ATP = \frac{4{,}32 \times 3{,}747 \times 100}{33{,}01} = 49{,}0368 \text{ n Mol/mg Protein x h}$$

$$= 0{,}049037 \ \mu \text{ Mol/h x 100 mg FG}$$

3.2.4.2.3.2. Bei schlagenden belasteten Vorhöfen.

$ATP_{MP3 - MP4}$ = Verlust ($ATP_{MP3 - MP4}$ + $CR_{MP3 - MP4}$)

= (2,41 - 2,23)

= 4,64 n Mol/mg Protein x h

bei einem mittleren Proteingehalt von 3,688 mg/Vorhof

ergibt sich dann:

$$ATP = \frac{4,64 \times 3,688 \times 100}{33,01} = 51,84 \text{ n Mol/h x 100 mg FG}$$

= 0,05184 µ Mol/h x 100 mg FG.

Aus 3.2.4.2.2.1. und 3.2.4.2.2.2. läßt sich dann folgende Energiebilanz tabellarisch zusammenstellen:

| | ruhende, unbelastete Vorhöfe | schlagende, belastete Vorhöfe |
|---|---|---|
| A. Sauerstoffverbrauch | 4,61±0,14 µ Mol/h x 100 mg FG | 5,10±0,18 µ Mol/h x 100 mg FG |
| daraus berechnete ATP-Bildung | 29,19 µ Mol /h x 100 mg FG | 32,30 µ Mol/h x 100 mg FG |
| B. Aerobe Laktatbildung | 0,777 µ Mol/h x 100 mg FG | 0,742 µ Mol/h x 100 mg FG |
| daraus berechnete ATP-Bildung | 0,777 µ Mol/h x 100 mg FG | 0,742 µ Mol/h x 100 mg FG |
| C. Summe aus A + B | 29,967µ Mol/h x 100 mg FG | 33,04 µ Mol/h x 100 mg FG |
| D. Anaerobe Laktatproduktion | 6,419 µ Mol/h x 100 mg FG | 15,904µ Mol/h x 100 mg FG |
| daraus berechnete ATP-Bildung | 6,419 µ Mol/h x 100 mg FG | 15,904µ Mol/h x 100 mg FG |
| E. Verlust an ATP (= ATP) | 0,04904 µ Mol/hx 100mg FG | 0,05184µMol/h x 100 mg FG |
| F. Gesamt ATP (Anaerob) | 6,468 µ Mol/h x 100 mg FG | 15,95584µMol/hx 100 mg FG |
| H. Quotient $\frac{\text{Anaerobes ATP}}{\text{Aeroben ATP}}$ | 21,58% | 48,29% |

Tabelle 20: Tabellarische Energiebilanz von ruhenden, unbelasteten Herzvorhöfen und schlagenden, belasteten Herzvorhöfen unter Normoxie und Anoxie mit Einbeziehung der Veränderung der energiereichen Phosphate zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4.

# 4. DISKUSSION

## 4.1. Abnahme der Kontraktionskraft in Normoxie mit zunehmender Versuchsdauer.

Seitdem an isolierten Herzmuskelpräparaten Einwirkungen auf die Kontraktionskraft untersucht werden, ist bekannt, daß die Kontraktionskraft im Verlauf des Versuches spontan nachläßt. Viele Autoren haben sich mit diesem Phänomen beschäftigt, das als Hypodynamie (H.WIELAND 1921) oder auch als "Ermüdung" beschrieben wurde.

Als Ursache kamen einmal Elektrolytverschiebungen in Frage. Schon früh war beobachtet worden, daß es in physiologischer Kochsalzlösung ohne Zusatz von Calcium und Kalium sehr rasch zu einem Nachlassen der Kontraktionskraft kommt, aber auch in einer mit Elektrolytzusätzen verbesserten Nährlösung wurde ein Nachlassen der Kontraktionskraft mit zunehmender Versuchsdauer beobachtet. H.WIELAND (1921) führte diese "Ermüdung" auf eine "Vergiftung" der Herzmuskulatur zurück, die er mit der Desoxycholatvergiftung verglich. Zusatz von u.a. Blutserum und Tierkohle verminderten die Desoxycholatvergiftung des Herzmuskelgewebes, führte jedoch auch bei einem unvergifteten Herzmuskel zu einer fast vollkommenen Aufhebung der beobachteten Ermüdung. Der Autor führte diese beobachtete Ermüdung auf den Stoffwechsel zurück, indem er annimmt, daß Stoffwechselprodukte entstehen, die die Herzarbeit vermindern.

Inwieweit die Untersuchungen der Ermüdung am Froschmyocard

von u.a. FREUD und KÖNIG (1927), W.BODENHEIMER (1971) und H.WIELAND (1921) auf das Warmblüterherz übertragbar sind, wurde aus der Sicht der Energiebereitstellung von W.SCHMID und M.SIESS (1956) untersucht. In diesem Sinne war es naheliegend, an einen Zusammenhang zwischen Ermüdung und Energiestoffwechsel zu denken. Tatsächlich führte Zusatz von Nährsubstraten des oxidativen Stoffwechsels zu einer verbesserten Leistung und einem deutlich verzögerten Abfall der Kontraktionsamplitude. Dieses gilt sowohl für das Froschherz, wie auch den Papillarmuskel und den isolierten Herzvorhof vom Warmblüter. Am Froschmyocard konnten W.SCHMID und M.SIESS (1956) auch noch nach 24 Stunden Normoxie eine annähernd gleiche Kontraktionskraft wie am Anfang kurz nach der Präparation beobachten, wenn genügend Glukose im Nährmedium vorhanden ist.

In diesem Falle blieb auch der Glykogengehalt voll erhalten. In glukosefreier Elektrolytlösung wurde dagegen eine fortlaufende Abnahme der Kontraktionskraft nach etwa 12 bis 24 Stunden beobachtet, welche zu einem Stillstand in Diastole führte. Rechtzeitige Zugabe von Glukose führte wieder zu einer Verbesserung der Kontraktionstätigkeit. Nur bei frühzeitiger Gabe wurde eine volle Restitution der Kontraktionskraft beobachtet. Beim Meerschweinchenherzvorhof ist naturgemäß durch die höhere Frequenz und die höhere Temperatur der Sauerstoffverbrauch aber auch die Kontraktionsleistung gegenüber dem Kaltblüterherzen wesentlich gesteigert. Die von O.WARBURG (1923) beschriebene Grenzschichtdicke für Sauerstoff wird vom Partialdruck des Sauerstoffs

in der Nährlösung bestimmt und beträgt bei Meerschweinchenherzvorhöfen etwa 0,3 mm. Es kann daher bei schwereren Herzvorhöfen zu einer anoxischen Innenzone kommen, in der bei ausreichender Glukosekonzentration von 15 mM dann die Bedingungen der anaeroben Glykolyse herrschen, d.h. das Glykogen wird abgebaut und es befindet sich eine scharf abgegrenzte mit Sauerstoff versorgte Randzone gegenüber einer glykogenfreien, anoxischen Innenschicht (W.SCHMID und M.SIESS 1956).

Unter den Bedingungen der anaeroben Glykolyse leisten diese Muskelfasern der Innenzone, obwohl sie sich zum Teil passiv mitbewegen, keinen wesentlichen Beitrag zur Kontraktionsarbeit. Die anaerobe Glykolyse reicht bei 30°C über 10 Stunden aus, um das Zelleben aufrecht zu erhalten. Vermindert man jedoch die Glukosekonzentration auf 5 mM oder darunter, so werden die anoxischen Bezirke auch nicht mehr genügend mit Glukose versorgt, und nach dem Aufbruch des Glykogens nekrotisieren die zentralen Innenbezirke, meist verbunden mit einer Erhöhung der diastolischen Spannung (Teilkontraktur). Es ist so erklärlich, daß dicke Papillarmuskelstreifen und auch Meerschweinchenherzvorhöfe einen sehr starken Abfall der Kontraktionskraft zu Beginn des Versuches aufweisen, wobei nach Einstellen eines vorübergehenden scheinbaren Gleichgewichts später dann wieder die Erscheinung der Ermüdung auftritt, die daher offenbar nicht nur auf anoxischen Energiemangel zurückzuführen ist. Diese Befunde konnten 1976 durch W.A.FREEZA und O.H.L.BING durch Sauerstoffmessungen be-

stätigt werden. Bei einem $PO_2$ von 550 mm Hg konnte am Rattenpapillarmuskel nur eine ausreichend mit Sauerstoff versorgte Randzone von 0,3 mm nachgewiesen werden. Die Innenzonen bei dickeren Präparaten waren unterversorgt. Bei zunehmendem Abstand von der Randzone wurde eine zunehmende Laktatproduktion gemessen, d.h. Energie wird hier anaerob aus gespeichertem Glykogen gewonnen, da diese Innenzonen mit aller Wahrscheinlichkeit genauso wenig mit Glukose versorgt werden wie mit Sauerstoff.

Auch in unseren Untersuchungen konnten wir unter Normoxie bei ruhenden unbelasteten Herzvorhöfen, eine, wenn auch geringere, Laktatproduktion nachweisen (0,53 bis 0,79 µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht. Dieses muß jedoch nicht unbedingt auf eine anoxische Innenzone zurückzuführen sein, da bekanntlich auch in der aeroben Glykolyse im Überschuß gebildetes Laktat aus der Zelle nach außen diffundiert. Allerdings können nach histochemischen Untersuchungen von U.RÖGER (1970) auch bei sehr kleinen Herzvorhöfen immer kleine hypoxische oder anoxische Zonen bestehen.

Inwieweit diese Laktatproduktion in der Innenzone des Gewebes einen Einfluß auf die Kontraktionskraft hat, wurde u.a. von I.CHANG (1937) untersucht. Eine Abnahme des pH vom Optimum verursacht eine Verminderung der Kontraktionskraft. Hiergegen spricht jedoch der Befund, daß Laktat das Muskelgewebe rasch verläßt (F.GOTTDENKER und M.WACHSTEIN 1933). Eine Verminderung des pH im Muskelgewebe

erscheint daher nicht maßgeblich für die Abnahme der Kontraktionskraft in Normoxie.

Ein entscheidender Faktor bei der Ermüdung der Kontraktionskraft erscheint eine Veränderung des Sarkoplasmatischen Retiklums ( S R) zu sein. MUIR, DHALLA, ORTEZA und OLSON (1970) wie auch R.E.OLSON und D.A.BARNHORST (1974) zeigten, daß bei einer Unterversorgung des Gewebes mit Glukose und Sauerstoff die Kapazität des S R, Calcium zu binden, vermindert ist. Damit kommt es zu einer verminderten elektromechanischen Koppelung und folglich Abnahme der Kontraktionskraft. Dieser Effekt wird ganz besonders deutlich, wenn keine Glukose im Nährmedium vorhanden ist. Bei der Elektrolytbestimmung im Gewebe (Abb.29) zeigte sich innerhalb der ersten 4 1/2 Stunden weder bei Calcium, Kalium noch Natrium signifikante Veränderungen die eine Erklärung für die Ermüdungserscheinungen geben können.

Untersuchungen von U.VON HEES (1976), mit Krebs Henseleit + 15 mM Glukose in Normoxie bei 30°C zeigten während der Ermüdung eine Abnahme des Kaliums bei Zunahme des Natriums, wobei sich der Calciumgehalt verdreifachte. Dieses wurde als eine allmähliche Insuffizienz der Natrium - Kalium Pumpe und einem Nachlassen des Calziumeffluxes gegen den überphysiologischen Calciumgehalt der Krebs Henseleitlösung gedeutet. Offentsichtlich sind die Verhältnisse bei höherer Temperatur und niederer Frequenz hiervon verschieden.

Es muß weiter daran gedacht werden, daß bei isolierten Herzmuskelpräparaten wichtige Stoffe aus den Zellen aus-

treten, welche für den Energiestoffwechsel sowie für die Elektrolytfluxe von Bedeutung sind. Dies zeigt besonders deutlich, daß Zusatz von Serum (H.WIELAND 1921) meist die Ermüdung verzögern kann. Interessant sind nun die Untersuchungen mit Präcursoren der energiereichen Phosphate wie Creatin und Adenin.

Wir fanden bei einem Zusatz von 1 mM Creatin unter Normoxie eine wesentlich geringere Ermüdung der Kontraktionskraft (Abb.27a). Dieser Befund könnte dafür sprechen, daß das isolierte Präparat Creatin an die Nährlösung abgibt, und dieser Creatinverlust verantwortlich ist für die Abnahme der Kontraktionskraft ("Ermüdung"). Einen Verlust an Creatin konnten wir in unseren biochemischen Untersuchungen beobachten; unter Normoxie finden wir innerhalb von 2 Stunden eine Abnahme der Creatinkonzentration von 21,59 $\pm$ 3,64 auf 14,27 $\pm$ 3,98 n Mol/mg Protein ($\Delta$ % = - 33,90%). Bei einer Versuchszahl von n=5 war dieser Unterschied allerdings nicht signifikant mit einem P von P$>$0,1 (Abb.33). W.SCHMID und M.SIESS (1956) beobachteten unter Anaerobiose und Glukosemangel im Verlauf der eintretenden Rückstandkontraktur einen Creatinverlust des Präparates. Es erscheint daher sehr wohl möglich, daß es in den schlechter versorgten Innenzonen zu einem Austritt von Creatin aus der Zelle kommt.

Zugabe von 0,1 mM Adenin wie auch der Kombination von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose führte innerhalb von 10 Minuten zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktionskraft, die mit zunehmender Versuchsdauer als Folge der "Ermüdung"

wieder abnahm. Jedoch war auch nach einer Stunde die Kontraktionskraft immer noch signifikant höher als die der Kontrollen (Abb.27b und 27c). Zugabe der Kombination von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose verursachte unter Normoxie eine signifikante Zunahme des Adeninnucleotidpools. Zugabe von 0,1 mM Adenin alleine hatte keine signifikante Wirkung auf den Adeninnucleotidpool (vgl. Tab.15).
Zusätze von Adenin und Ribose wie auch Adenin + Ribose können eine fortgeschrittene Ermüdung über eine positiv intrope Wirkung deutlich verzögern.

Es ergibt sich daraus der Schluß, daß außer einer adäquaten Elektrolytzusammensetzung auch hinsichtlich des Calciums und einem Nährsubstrat des oxidativen Stoffwechsels (Glukose oder Fettsäuren) auch Zusätze der Präcursoren der energiereichen Phosphate dazu beitragen, die "Ermüdung" des isolierten Muskelpräparates zu verzögern. Weitere Faktoren dürften u.a. auch Catecholamine sein, die ebenfalls in die Nährlösung abgegeben werden. Daß die Ermüdung noch von ganz anderen Faktoren abhängig ist, zeigen die Untersuchungen über die Kraft-Frequenz-Beziehungen bei verschiedenen Temperaturen in Normoxie. Bei 25°C wurden bei Variation der Frequenz von 0,5 bis 2,5 Hz entsprechend der "Kälteinotropie" bei niederen Frequenzen bereits sehr hohe Kraftentwicklungen beobachtet, wobei das Maximum bei 1,75 Hz liegt. Bei 30°C und 35°C lag bei 0,5 Hz die Kraftentwicklung bei 35% des Maximums, das bei 30°C bei 1,5 Hz, bei 35°C erst bei 2,0 Hz erreicht wurde. Deutlich konnte also eine Rechtsverschiebung der Maxima bei hohen Frequenzen

mit Zunahme der Temperatur beobachtet werden. Die Maxima der Kontraktionskraft lagen bei allen 3 Temperaturen in annähernd dem gleichen Bereich (Abb.12+14). Diese Relation stimmt überein mit einer anderen Versuchsserie bei physiologischer Temperatur des Meerschweinchens von 38,5°C (Abb. 13). Bei einer Frequenz von 0,5 Hz werden 35% der maximalen Arbeit pro Schlag ($A_s$) geleistet. Das Maximum liegt bei dieser Temperatur jedoch bei 5,0 Hz. Ähnliches wurde auch von V.KTUTA (1937) beobachtet.

Auffallend ist nun, daß bei hoher Temperatur und geringer Reizfrequenz, die Ermüdungserscheinung widererwarten sehr ausgeprägt ist, obwohl die Kontraktionskraft hier sehr niedrig ist. Man gewinnt den Eindruck, daß es für jede Temperatur einen Frequenzbereich gibt, bei der die Ermüdung sowohl absolut als auch relativ am geringsten ausgeprägt ist. Wie aus Abb.15 hervorgeht, ist bei 38,5°C und der annähernd physiologischen Frequenz des Meerschweinchenherzvorhofes von 5,0 Hz die Ermüdung deutlich geringer als bei einer Frequenz von 0,5 Hz oder 1,5 Hz. Inwieweit sich hier die Dauer des Aktionspotentials und die Stoffwechselgrößen auf die Calciumfluxe zwischen den einzelnen Kompartimenten auswirken, ist bis jetzt unbekannt.

Unsere Untersuchungen dienten dazu, bei dem Energiegewinn aus einer optimalen anaeroben Glykolyse die größtmögliche Kontraktionskraft zu erzielen. Hierbei erwies sich eine Temperatur von 35°C und 0,5 Hz am günstigsten, obwohl die Ermüdung in Normoxie sehr ausgeprägt war und im Verlauf

von 4 Stunden auf etwa 10% des Ausgangswertes absank.

4.2. Anoxietoleranz und Anoxietest.

Um in der Anoxie eine Kontraktionskraft aufrecht erhalten zu können, muß der Energieverbrauch des Herzvorhofes so weit wie möglich reduziert werden und genügend Energie durch die anaerobe Glykolyse bereitgestellt werden. Dieses wurde erreicht durch:

a.) Herabsetzen der Schlagfrequenz auf 0,5 Hz und der damit verbundenen negativen Inotropie und
b.) Steigerung der Versuchstemperatur auf 35°C.

Bei der Bestimmung der Anoxietoleranz - der Zeit bis zum Erlöschen der Kontraktionskraft unter Anoxie - zeigte sich bei verschiedenen Temperaturen und Frequenzen deutlich, daß die höchste Anoxietoleranz bei 35°C (gegenüber 25°C und 30°C) erzielt wurde. Der höchste Wert wurde bei 0,5 Hz beobachtet (Abb.19). Bei 38,5°C und 0,5 Hz ist die Kontraktionsleistung höher; es kommt aber in der Anoxie zu rascherem Stillstand. Offenbar ist hier das Verhältnis von Energieverbrauch durch Kontraktionsleistung zur Glykolysesteigerung bei 38,5°C ungünstiger. Dies war der Grund, daß die Versuche über die Anoxietoleranz und der Anoxietest bei 0,5 Hz und 35°C durchgeführt wurden.
In den Versuchen, bei denen nach einer Stunde Normoxie eine einmalige Anoxiephase herbeigeführt wurde, konnte eine reduzierte Kontraktionsarbeit über 6,6 ± 1,55 Stunden (von 5,5 bis max. 8,5 Stunden) beobachtet werden (Abb.20,21 + 22).

Der Energieverbrauch unter diesen Bedingungen ist soweit gesenkt, daß es möglich ist, ihn durch die anaerobe Glykolyse zu decken und eine Kontraktionsarbeit erhalten bleibt. Daß wiederholte Erstickungsphasen über einen langen Zeitraum diesen Wert herabsetzen, ist verständlich. So wurde in den bereits erwähnten Versuchen mit 8 Erstickungsphasen über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 35°C und 0,5 Hz nur eine mittlere Anoxietoleranz von 51,4 Minuten erreicht.

Es muß hierbei jedoch immer bedacht werden, daß in Normoxie bei 0,5 Hz und 35°C nur ca 20-35% der Kontraktionsarbeit geleistet werden, die bei 2,0 bis 2,5 Hz beobachtet wird. Auffallend ist nun, daß unter Anoxie die Kontraktionskraft über einen langen Zeitraum auf etwa 50 bis 80% dieses normoxischen Kontrollwertes gehalten wird, während die Sauerstoffkontrolle nach 3 Stunden als Ermüdungserscheinung deutlich unter diesem Wert liegt. Paradoxerweise ist in der Anoxie unter diesen Bedingungen die Kontraktionskraft signifikant höher als zum gleichen Beobachtungszeitpunkt unter Normoxie. Eine Erklärung hierfür kann zunächst nicht gegeben werden (Abb.21).

### 4.2.1. Verlauf der Kontraktionskraft im Anoxietest bei 0,5 Hz und 35°C.

Beim Umschalten von Normoxie (=Kontrollwert = 100%) auf Anoxie konnten wir innerhalb der ersten Minuten einen signifikanten Anstieg der Kontraktionskraft auf 140% beobachten. Dies ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf eine Catecholamin-

ausschüttung des Vorhofes zurückzuführen, da dieser Peak bei Vorgabe eines ß-Blockers ($2{,}013 \times 10^{-7}$M Pindolol) nicht auftrat (vgl. Abb.38). Dieser Befund steht in Einklang mit Befunden anderer Autoren; so das Zitat von P.G.SPIEKERMAN (1973)

> "Kurz nach Eintritt des Sauerstoffmangels kommt es bei erhaltener Durchströmung des Myocards zu einer Katecholmobilisierung (WOLLENBERGER und SHAHAB (1965); sie erklärt die häufig zu beobachtende verstärkte Aktion zu Beginn des Sauerstoffmangels".

Innerhalb der folgenden 15 bis 25 Minuten beobachteten wir eine Abnahme der Kontraktionskraft bis auf ca 20%, die in der folgenden Stunde wieder auf 50% bis 80% des normoxischen Initialwertes anstieg.
Nach zwei Stunden Anoxie wurde im Anoxietest wieder auf Normoxie umgeschaltet. Die Kontraktionskraft nahm in Form eines überschießenden Peaks im Mittel auf 450% des normoxischen Kontrollwertes zu, um dann in den darauffolgenden 1 1/2 Stunden stark abzufallen auf Werte, die denen der normoxischen Kontrollen entsprechen (Abb.21).
Zur Erklärung dieses Phasenverlaufes der Kontraktionskraft in Anoxie ist eine Analyse der anaeroben Energiebilanz aufschlußreich.

### 4.2.2. Anaerobe Glykolyse

Bekanntlich ist die anaerobe Glykolyse mit der Laktatbildung der einzige Energiespender in der Anaerobiose. Da

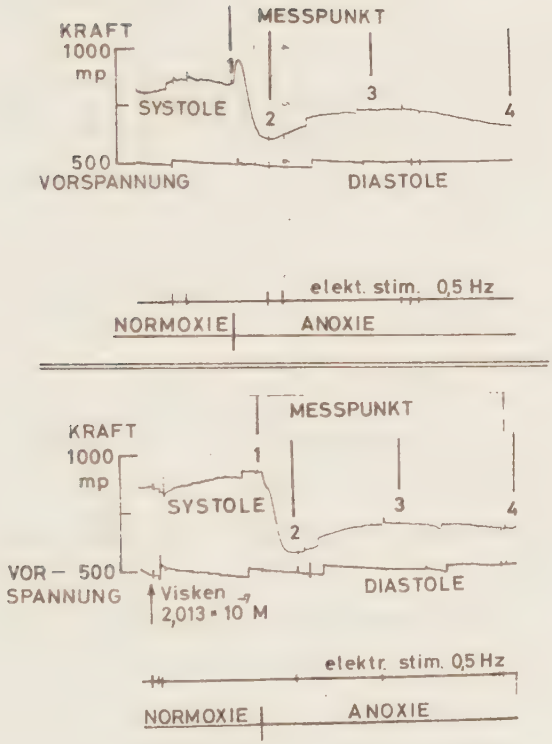



Abb.37: Originalkurve von zwei Versuchen mit und ohne Vorgabe von $2{,}013 \times 10^{-7}$M Pindolol vor der Anoxiephase. Pindolol unterdrückt die Zunahme der Kontraktionskraft in Form eines Peaks am Anfang der Anoxie, hat jedoch keinen Einfluß auf die Erholungsphase der anaeroben Kontraktionskraft zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3.

das gespeicherte Glykogen im Myocard in der Anaerobiose nicht ausreicht ist es erforderlich, Glukose zum Nährmedium hinzuzufügen. Über die anaerobe Glykolyse wird aus Glukose, zwar mit einer geringeren ATP-Bildung pro Mol (2 ATP) als aus gespeichertem Glykogen (3 ATP), genügend Energie zum Überleben des Myocards in der Anoxie bereitgestellt, unter unseren Bedingungen sogar zur Erhaltung einer reduzierten Kontraktionsarbeit (vgl. W.SCHMID und M. SIESS 1956; D.J.HEARSE und E.B.CHAIN 1972; R.G.PENN 1964; M.W.WINBURY 1956).

Die Glykogenvorräte des Herzvorhöfes schwinden bei Anwesenheit von 15 mM Glukose bei 30°C nach Untersuchungen von ITZEL (1969) nach etwa 60 Minuten. Bei 35°C dürfte dieses schneller gehen; aber sicher ist es nicht so, daß die Laktatproduktion allein aus dem Glykogen stammt, sondern daß auch bereits zu Beginn der Anoxie exogene Glukose daran beteiligt ist. Da aus Glykogen pro Mol mehr ATP gewonnen wird als pro Mol Glukose, könnte hier aus der Glykogenolyse tatsächlich eine geringfügig verminderte Laktatbildung bei gleicher ATP - Gewinnung resultieren. Die Frage ist allerdings, ob nicht die Laktatbildung aus exogener Glukose rascher verläuft als die Spaltung des Glykogens. Frühere Versuche (W.SCHMID und M.SIESS 1956) haben gezeigt, daß das Froschherz volle anaerobe Kontraktionskraft nur zeigt, wenn Glukose zugesetzt war. Ohne Glukose trat in der Anaerobiose Stillstand ein, obwohl das Froschherz reichlich Glykogen gespeichert hatte (M.SIESS persönliche Mitteilung). Ob dieser Unterschied beim Warmblüter vor-

handen ist, müßten erst Versuche ohne Glukosezusatz mit diesem Anoxietest zeigen.

In der Anoxie wird bei schlagenden belasteten Vorhöfen der Glukoseverbrauch/Stunde gegenüber der Aerobiose um das 6,52-fache gesteigert. Auch bei einer Erhöhung der Glukosekonzentration im Nährmedium von 15 mM auf 30 mM konnte keine signifikante Veränderung der Laktatproduktion/Stunde gemessen werden, d.h. wir befinden uns mit 15 mM Glukose im Nährmedium im Bereich der Sättigung der Glykolysegeschwindigkeit.

Auch eine Steigerung der Kontraktionsarbeit/Schlag ($A_S$) hat keinen Effekt auf die Laktatproduktion.

J.R.WILLIAMSON (1962) zeigte am perfundierten Rattenmyocard, daß unter Anoxie der Glukoseverbrauch bei 5 mM Glukose im Nährmedium im Vergleich zur normoxischen Kontrolle 10-fach gesteigert ist. Durch Erhöhung der Glukosekonzentration von 5 mM auf 10 mM wurde die anaerobe Glykolyse noch um das Doppelte gesteigert. Im Unterschied zu 5 mM konnte ein Insulinzusatz von 20 mU/ml die anaerobe Glykolyse bei 10 mM Glukose nicht mehr weiter steigern. Damit kann ab 10 mM Glukose in Durchströmungsversuchen mit einer Sättigung der anaeroben Glykolysegeschwindigkeit gerechnet werden.

4.2.2.1. Steigerung der Glykolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit.

Ein weiterer maßgeblicher Faktor der anaeroben Energiegewinnung ist, daß nicht sofort nach dem Umschalten auf

Anoxie die maximale Glykolysegeschwindigkeit erreicht wird, sondern langsam zunimmt. Dieses ist wohl der bedeutenste Faktor zur Erklärung der Abnahme und der Erholung der anaeroben Kontraktionskraft. Am Anfang der Anoxie überwiegt der Energieverbrauch durch die Kontraktionsarbeit mit Spaltung des Creatinphosphates mit einer folgenden Abnahme der Kontraktionskraft die Energiegewinnung aus der anaeroben Glykolyse. Nach einer "Anlaufphase" der anaeroben Glykolyse erhöht sich die Energiegewinnung und daraus resultierend wieder auch die Kontraktionskraft.
Die Laktatproduktion pro Stunde war bis zum Zeitpunkt der geringsten entwickelten Kontraktionskraft innerhalb der ersten 20 Minuten in allen Versuchen signifikant geringer. Die Laktatproduktion erhöhte sich bis zur ersten Stunde Anoxie um 51,26% (Meßpunkt 2 bis Meßpunkt 3) und erreichte zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4 ($\Delta$ % = + 11,28%) ein Plateau der maximalen Glykolysegeschwindigkeit. Diese Steigerung der Laktatproduktion korreliert zeitlich mit der Erholungsphase der anaeroben Kontraktionskraft.
Bei den ruhenden, unbelasteten Herzvorhöfen konnten wir das gleiche Verhalten der Laktatproduktion pro Stunde beobachten, nur liegen die Werte insgesamt um ca 50% niedriger.

Interessant ist nun, daß nach 2 Stunden Anoxie beim Umschalten auf Aerobiose die maximal gesteigerte Laktatproduktion nicht sofort gestoppt wird (Abb.31). Mit 4,4 bis 5,88 $\mu$ Mol/Stunde x 100 mg Feuchtgewicht liegt die

Laktatproduktion hier zwar weit unter der der anoxischen Werte (14,0 µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht), aber bedeutend über der normoxischen Laktatbildung (0,77 µ Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht) ohne vorherige Anoxie. Zu diesen Versuchen aus Abb.31 wurden keine vergleichbaren Untersuchungen unter Normoxie durchgeführt. Daher kann vorerst nicht mit Sicherheit ausgesagt werden, ob diese gesteigerte normoxische Laktatproduktion durch die Steigerung der Kontraktionskraft mit g-Strophanthin verursacht wird, oder ob die anaerobe Glykolyse beim Umschalten auf Normoxie nicht sofort gestoppt werden kann.

4.2.3. Die Veränderungen der energiereichen Phosphate im Anoxietest.

Die energiereichen Phosphate im Myocard stellen im Gegensatz zu Glukose und Glykogen keine physiologische Energiereserve im strengsten Sinne dar, da sie in dauerndem Umsatz zur Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Zelle notwendig sind. Bei Energiemangel, z.B. bei Umstellung des aeroben Stoffwechsels auf Anoxie, reduziert die Zelle als erstes ihre spezifische Zellfunktion, um die "Lebenserhaltung" zu verlängern oder zu retten. Daß aus dem gespeicherten Glykogen nur über eine relativ kurze Zeit eine Lebenserhaltung möglich ist und die Wiederbelebung und Erhaltung des Lebens durch Glukose im Nährmedium wesentlich verlängert ist, haben die Untersuchungen vieler Autoren gezeigt. (W.SCHMID und M.SIESS 1956; M.W.

WINBURY 1956; J.SCHEUER und S.W.STEZOKI 1970).
Einen schützenden Effekt der Glukose während der Anoxie auf den Verlust von Creatinfruktokinase und L-Leucyl-ß-Naphthylaminase beschrieben 1976 D.J.HEARSE und P.B.GARLIK.
An Hand der Veränderungen der energiereichen Phosphate, wie auch an der Wiedergewinnung der aeroben Kontraktionskraft nach Anaerobiose, zeigten D.J.HEARSE und E.B.CHAIN (1972) die Bedeutung von ausreichend Glukose im Nährmedium während der Anaerobiose. Übereinstimmend ist die Meinung, daß ein Abfall der ATP-Konzentration auf 40 bis 50% des normoxischen Wertes und ein Abfall des Creatinphosphates auf etwa 2% die Grenze der Lebenserhaltung, und einer wenn auch reduzierten Wiederbelebung, darstellt. Diese Werte werden unter Anaerobiose bei Glukosemangel innerhalb von 10 Minuten (Creatinphosphat) bis 20 Minuten (ATP) erreicht (D.J.HEARSE und E.B.CHAIN, 1972).
Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3. wurden aus insgesamt drei Versuchsserien gewonnen, die hier zusammen diskutiert werden. Die in der Diskussion angegebenen Daten entsprechen jeweils einer Versuchsserie. Die Daten wurden aus statistischen Gründen nicht zusammengezogen. Zu jeder Versuchsserie wurden als Vergleichspunkte die entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Bedingt durch die Effekte der biologischen Streubreite, Jahreszeiteneffekte, und im geringerem Maß eine verbesserte Handhabung der einzelnen Proben sprach gegen einen Zusammenzug aller drei Versuchsserien, so daß die einzelnen Ergebnisse in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen beurteilt werden müssen. Die Unterschie-

de der einzelnen Serien waren sehr klein. Dennoch wurden die einzelnen Serien mit den Kontrollen getrennt aufgeführt.

4.2.3.1. Adeninnucleotide

Die wichtigste energiereiche Phosphatverbindung ist das ATP, das mehr als 90% der gesamten myocardialen Triphosphate ausmacht. CTP, UTP und GTP spielen im Vergleich hierzu quantitativ nur eine untergeordnete Rolle (P.G.SPIECKEMANN 1973). Von FOX et al. (1965) wird der Anteil des ATP an den Gesamtnucleotiden mit 84% angegeben.
Das Verhältnis ATP zu ADP verändert sich, wenn ATP im Sauerstoffmangel zerfällt. Als schnell verfügbare Energiereserve mit der Aufgabe, kurzfristige Schwankungen des zellulären ATP-Besatzes abzupuffern, ist dem ATP-ADP-System das Creatinphosphat - Creatin - System über die Creatinkinasereaktion im Nebenschluß zugeordnet. Bei nur geringer Veränderung des ATP-Spiegels muß es zu einer Veränderung des Gleichgewichts an der Creatinkinase kommen. Als Folge wird die energiereiche Phosphatgruppe des Creatinphosphates auf ADP übertragen und so ATP resynthetisiert. Bekannt ist, daß das Creatinphosphat-Creatinsystem nur mit einem kleinen Anteil des bilanzmäßig erfaßten ATP-ADP-Systems im Gleichgewicht steht. Diese Fraktion dürfte für die Kontraktion des Muskels entscheidend sein (W.KÜBLER et al. 1968). Im Sauerstoffmangel zerfällt zunächst die ATP-Fraktion an den kontraktilen Proteinen, die etwa 5% bis 10% des Gesamt ATP-Gehalts ausmacht (K.HELLBERG 1970). Dieses wird aber bis zur Erschöpfung des Creatinphosphat - Creatin - Systems

durch dieses wieder aufgefüllt. Die Kompartimentierung des ATP erklärt die Beobachtung, daß das Nachlassen der Kontraktionskraft des Myocards mit dem Abfall des Creatinphosphates korreliert und trotz der noch fast normalen Gewebsgehalte an ATP abnimmt (EGGLETON und EGGLETON 1929; DÖRING und KAMMERMEIER 1964).

Die geringe Reduzierung des ATP-Gehalts während des Creatinphosphatzerfalls ist durch Abbau des für die Kontraktion verantwortlichen, mit dem Creatinphosphat im Gleichgewicht stehenden kleinen ATP-Anteils bedingt. Nach P.G. SPIECKERMANN (1973) kommt es zu einem stärkeren ATP-Abbau erst wenn das Creatinphosphat um 70% bis 80% reduziert ist. Dieser Wert stimmt überein mit den Ergebnissen von EGGLETON und EGGLETON (1929), die einen Wert von 75% angeben.

Die Veränderungen der Adeninnucleotide (ATP, ADP, AMP) sofort nach dem Einsetzen des Sauerstoffmangels sind aus unseren Versuchen nicht ersichtlich, da die ersten biochemischen Analysen erst zum Zeitpunkt der geringsten entwickelten Kontraktionskraft durchgeführt wurden. Jedoch ist die genannte zeitliche Verschiebung des ATP-Zerfalls gegenüber dem Zerfall des Creatinphosphats deutlich erkennbar (Abb.32). Auffallend ist hier, daß innerhalb der ersten Stunde Anaerobiose die ATP-Konzentration schneller abfällt als in der zweiten Stunde. Ein Gleichgewichtswert wird hier ausgebildet. Die ADP- und AMP-Konzentrationen sind bereits zum ersten anaeroben Meßpunkt (=Meßpunkt 2) signifikant erhöht im Vergleich zur normoxischen Kontrolle.

Bei zunehmendem Versuchsverlauf fallen diese Werte nur geringfügig ab und stellen sich also auf ein Gleichgewicht mit 161,87% bzw. 207,69% der normoxischen Kontrollen ein.

Der Adeninnucleotidpool verändert sich während der ersten 20 Minuten Anaerobiose kaum. Jedoch fällt er signifikant ab zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3, bis zu einem Plateau zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4, welches 73,19% der normoxischen Konzentration beträgt. Die Erholungsphase der anaeroben Kontraktionskraft korreliert zeitlich mit der Verminderung des Adeninnucleotidpools, der maßgeblich durch die Verminderung der ATP-Konzentration bestimmt wird. Die gesteigerte Glykolysegeschwindigkeit wirkt sich hier noch nicht in einer Verlangsamung des ATP-Abfalls aus, im Unterschied zum Creatinphosphat.

Inwieweit die verringerte ATP-Konzentration sich prozentual an den kontraktilen Elementen bemerkbar macht, ist schwer zu sagen. Eine Verbesserung der Kontraktionskraft durch g-Strophanthin auf 60% der Werte bei Normoxie spricht dafür, daß genügend ATP-Bindungsstellen an den Myosinköpfen auch in der Anoxie erhalten bleiben. Man könnte sich vorstellen, daß als Folge der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung zuerst die mitochondrialen Energiespeicher abnehmen.

4.2.3.2. Creatinphosphat (Abb.38)

Creatinphosphat liegt auch nach unseren Befunden in der doppelten Konzentration von ATP vor. Creatinphosphat liegt

nach der allgemeinen Meinung im cytoplasmatische Kompartiment vor und dient dazu, das an den kontraktilen Proteinen beim Kontraktionsvorgang zu ADP gespaltene ATP zu rephosphorylieren. Diesem Vorgang dient die cytoplasmatische Creatinkinase II. Creatinkinase I wird an der Membran der Mitochondrien beschrieben (S.GUDBJARNASON, P.MATHES und K.G.RAVENS; 1970). Ihr wird eine wesentliche Übertragungsmöglichkeit von intramitochondrial gebildetem energiereichem Phosphat auf cytoplasmatisches Creatin zugeschrieben, während Translokasen direkt den Austausch zwischen mitochondrialen und cytoplasmatischen Adeninnucleotiden ermöglichen. Außerdem dient auch cytoplasmatisch gebildetes ATP aus der Glykolyse über die cytoplasmatische Creatinkinase III zur Regenerierung des Creatinphosphats wenn auch in viel schwächerem Ausmaße. Entsprechend anderer Autoren kommt es auch in unseren Versuchen in Anoxie zu einem Creatinphosphatabfall, welcher den von ATP weit übertrifft und zeitlich vorausgeht. Zum Zeitpunkt der stärksten negativen inotropen Wirkung ist der Creatinphosphatgehalt auf 22,88% abgefallen, bei gleichzeitig erhöhtem Creatingehalt. Nach Untersuchungen von S.GUDBJARNASON, P.MATHES und K.G. RAVENS (1970); S.IMAI, A.L.RILEY und R.M.BERNE (1964); I.CHANG (1938) ist bei Coronarverschluß anzunehmen, daß der Zerfall von Creatinphosphat bereits in den ersten Minuten ein Maximum erreicht. Unsere nach 20 Minuten gemessenen Werte stellen möglicherweise bereits wieder einen höheren Wert dar, welcher aus der sich steigernden Glykolyse bei gleichzeitig stark herabgesetzter Kontraktions-

kraft resultieren könnte.
Ähnlich wie bei ATP verläuft der CP-Abfall zwischen der zweiten und dritten Stunde Anoxie wesentlich langsamer und Werte von 9,03% nach der zweiten Stunde Anoxie liegen noch deutlich über den für die Lebensfähigkeit beobachteten Grenzwerten von 2%. Die auffällige Diskrepanz zwischen dem geringen Abfall von ATP bei sehr starkem Abfall von Creatinphosphat ist von den vorher erwähnten Autoren nachgewiesen worden.

Der Creatinpool (CR + CP) verändert sich in den ersten 20 Minuten der Anoxie nur sehr gering, obwohl die unterschiedlichen Konzentrationen an Creatin und Creatinphosphat signifikant verändert sind. Zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3 fanden wir eine Abnahme des Creatinpools, ein Plateau wird erreicht zwischen Meßpunkt 3 und Meßpunkt 4, so daß zum Meßpunkt 4 eine signifikante Abnahme des Creatinpools im Vergleich zur normoxischen Kontrolle beobachtet werden konnte ($\Delta\% = -20{,}77\%$; $P<0{,}01$).

Aus den Untersuchungen von S.GUDBJARNASON, P.MATHES und K.G. RAVENS (1970) wird deutlich, daß es am Anfang der Anoxie zu einer Zunahme der Phosphofruktokinaseaktivität kommt. Dieses Enzym steigert die Glykolyse. Kurz darauf kommt es zu einer Steigerung der Aktivität der NAD spezifischen Isocitratdehydrogenase, die ihrerseits wiederum die Aktivität der Creatinkinase auf 60% bis 70% steigert, so daß das in der Anoxie zu ADP zerfallene ATP an den kontraktilen Proteinen fortlaufend regeneriert wird, bis das vor-

handene Creatinphosphat verbraucht ist. Da das Gesamt-ATP nicht im gleichen Maße wie das Creatinphosphat abfällt, wird angenommen, daß die mitochondriale Creatinkinase vermutlich durch die Laktatproduktion mit zunehmender Säuerung gehemmt wird (S.GUDBJARNASON et al. 1970). Da Creatinphosphat ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist, während das Adeninnucleotidsystem im Verhältnis 1:1 zwischen Mitochondrien und Cytoplasma lokalisiert ist, wird es verständlich, daß ein Stopp des Energietransfers aus dem ATP der Mitochondrien in Anaerobiose zu einem langsameren Abfall des Gesamt-ATP führt.

Aus Untersuchungen von J.R.PARRATT und R.J.MARSHALL (1974) am isolierten linken Meerschweinchenherzvorhof wird deutlich, daß Zusatz von 0,118 mM ATP, mit der bekannten negativen inotropen Wirkung, die Anoxietoleranz um 25% verlängert. Zusatz von Creatinphosphat im Konzentrationsbereich von 0,47 mM bis 4,74 mM verlängerte die Anoxietoleranz dosisabhängig von 14% bis 60%, während Zusatz von Creatin keinen Effekt auf die Anoxietoleranz hatte.
Diese durch ATP und Creatinphosphat verlängerte Anoxietoleranz führten die Autoren auf einen schützenden Effekt des Muskelgewebes gegen die negativen inotropen Auswirkungen der Anaerobiose hin, weisen jedoch auch darauf hin, daß ATP und auch Creatinphosphat die Zellmembran nur schwer passieren können. ATP besonders wird durch die ATPasen zu ADP, AMP und Adenosin abgebaut (vgl. S.V.HOPKINS 1973). Dieses Adenosin wiederum wird durch aktiven Transport

(R.A.OLSSON, J.A.SNOW, M.K.GENTRY und G.P.FRICK 1972) oder durch einfache Diffusion (J.SCHADLER, R.M.BRENE und R. RUBIO 1972) in die Herzzellen aufgenommen und zu ATP rephosphoryliert.

Eine Erklärung für die Verlängerung der Anoxietoleranz wird von J.R.PARRATT et al. nicht gegeben.

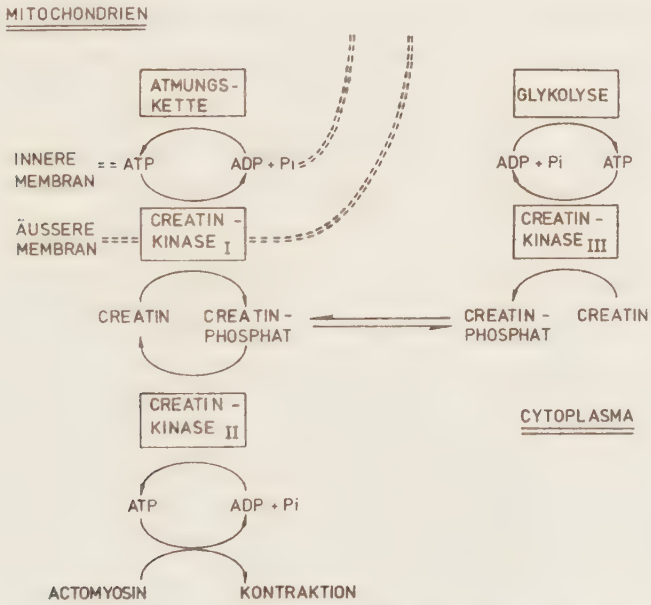



Abb.38: Kompartimentierung von ATP und Creatinphosphat im Herzmuskel und die möglichen Synthese- und Abbauwege der energiereichen Phosphatbindungen vom Ort der Synthese in den Mitochondrien bis zum Verbrauch an den kontraktilen Proteinen. - Modifiziert nach S.GUDBJARNASON et al. (1970).

P.G.SPIEKERMANN (1970) konnte durch Untersuchungen am Hund in der Frühphase der Ischämie einen Abfall des Creatinphosphates beobachten, dem eine Verminderung von Granula in den Mitochondrien parallel geht. Im nachfolgenden Stadium der ATP-Reduktion tritt eine Schwellung der Mitochondrien, verbunden mit Auflösung der Cristae auf. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß immer bedacht werden, daß mit unseren biochemischen Analysen lediglich Metabolitgehalte der Zellen und nicht die lokalen stationären Konzentrationen in bestimmten Zellkompartimenten meßbar sind. Da jedoch die Empfindlichkeit verschiedener Zellstrukturen gegen Sauerstoffmangel sehr unterschiedlich ist, erlauben die bilanzmäßig in den Zellen gefundenen Metaboliten keine zwingenden oder kausalen Rückschlüsse auf die Funktion und Anoxietoleranz. Die fehlende Möglichkeit einer räumlichen Zuordnung einzelner Metabolite in der Zelle schränkt auch die Aussagefähigkeit von Untersuchungen über die Stoffwechselregulation ein.
Nach W.KÜBLER (1970) gilt dieses jedoch nur für die Analyse von Stoffwechselvorgängen, die in mehreren Kompartimenten ablaufen; für die Beurteilung von Reaktionen, die nur im cytoplasmatischen Raum ablaufen, - wie z.B. der Glykolyse - dürfte demgegenüber durch die Nichtberücksichtigung der Zellkompartimentierung kein prinzipieller Fehler entstehen.

Betrachtet man nun in Verbindung mit den genannten Hypothesen die Funktionskurven unserer Ergebnisse, so ist bemerkenswert, daß bei einer stark reduzierten und langsam

weiter absinkenden Creatinphosphatkonzentration zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3 eine Erholung der Kontraktionskraft eintritt, die noch z.B. mit g-Strophanthin gesteigert und über einen Zeitraum von 21,2 $\pm$ 3,3 Stunden ausgedehnt werden kann (Abb.22). Der Schwellenwert der ATP- und CP-Konzentrationen für irreversible Schädigungen scheint damit am Meerschweinchenherzvorhof bei 0,5 Hz bei 35°C und 15 mM Glukose nicht erreicht zu werden. Die anaerobe Glykolyse reicht sogar aus, um eine reduzierte Kontraktionskraft aufrecht zu erhalten.

### 4.2.4. Elektrolyte

Grundlage der Erregbarkeit der Herzmuskelzellen ist die Eigenschaft der Zellmembran, spontan (Schrittmacher) oder induziert (Reizleitungssystem - Myocard) die Permeabilität für Natrium in einer ersten und für Kalium in einer zweiten Phase zu erhöhen. Das sich hieraus ergebende Aktionspotential führt zur Freisetzung von ionisiertem $Ca^{++}$ und zur Kontraktion des Actomyosinsystems. Für die Aufrechthaltung der Konzentrationsgradienten für Kalium und Natrium ist die in der Zellmembran lokalisierte Natrium - Kalium Pumpe erforderlich. Die für die Pumpenleistung benötigte Energie wird durch die Spaltung energiereicher Phosphate durch die $Mg^{++}$-abhängige Membran-ATPase geliefert. Daraus wird verständlich, daß bei Abnahme des gebildeten ATP und gleichzeitigem Verbrauch durch die Kontraktilität, über eine Abnahme der Pumpenleistung an der Membran, es zu

einem Kaliumausstrom und einem Natriumeinstrom führt, wie es auch von vielen Autoren beschrieben wurde (H.J.SIMON 1974).

Unsere Befunde (Abb.29) zeigen nach einer Stunde Anoxie gegenüber den normoxischen Kontrollen eine angedeutete Zunahme des Natrium- und eine leichte Abnahme des Kalium-Gehaltes. Die Werte halten sich bis zur zweiten Stunde Anoxie auf einem Plateau. Nach Sauerstoffzufuhr steigt die Kaliumkonzentration an, während die Natriumkonzentration keine eindeutige Veränderung mehr zeigt. Die Veränderungen des Calciumgehalts lassen während der Erstickung keine sicheren Schlüsse zu. Man könnte den Eindruck gewinnen, daß zum Zeitpunkt des stärksten Kontraktionsabfalles in den ersten 20 Minuten der Anoxie auch ein Calciumabfall resultiert. Innerhalb der folgenden 1,66 Stunden anaerober Kontraktionskraft konnte keine wesentliche Verschiebung des Calciumgehaltes im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen beobachtet werden. Zum Zeitpunkt des stärksten positiv inotropen Peaks, 3 Minuten nach Wiederumschalten auf Normoxie, wurde ein höherer Calciumgehalt gemessen, der jedoch bei der großen Streubreite und der geringen Versuchsanzahl nicht signifikant ist.

Diese geringen, nicht signifikanten Veränderungen des Calciumgehaltes können nur nach der Tendenz beurteilt werden. Da Calcium aktiv unter Energieverbrauch in die Mitochondrien gepumpt wird, ist es vorstellbar, daß unter Anoxie bei Energiemangel Calcium aus den Mitochondrien in das

Cytosol gelangt (vgl. u.a. G.A.LANGER, 1974). Da die "Calciumpumpe" der Mitochondrien umkehrbar ist, kann während des Calciumverlustes aus den Mitochondrien in das Cytosol ADP zu ATP rephosphoryliert werden. Über die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist bis heute nichts genaues bekannt. Inwieweit hier ein Grund des langsamen ATP Zerfalls zu suchen ist, kann aus den Befunden nicht gesagt werden. Daß die gesteigerte anaerobe Glykolyse Energie für die 2. Calciumpumpe im S.R. bereitstellt, erscheint möglich, da in der Anoxie die Calciumkonzentration ohne Rückstandskontraktur wieder auf anaerobe Kontrollwerte ansteigt, wird also in der Diastole alles freigesetzte Calcium zurückgebunden.

R.E.OLSON und D.A.BARNHORST (1974) deuten auf eine verminderte Calciumbindungskapazität des sarkoplasmatischen Retikulums in Anaerobiose hin mit einer folglichen Anhäufung von Calcium im Cytosol. Durch diese genannten intrazellulären Calciumfluxe kommt es jedoch während der Anoxie zu keiner Abnahme der Calciumkonzentration im Gewebe, sondern erst, wenn dieses Calcium in den Extrazellulärraum gelangt. Dieser Mechanismus ist jedoch heute noch Gegenstand von Hypothesen und soll hier nicht weiter besprochen werden.

Der kurzfristige Anstieg der Kontraktionskraft in Form eines Peaks nach Wiederumschalten auf Normoxie kann möglicherweise auf ein vermehrtes Calciumangebot an den kontraktilen Proteinen zurückgeführt werden, entweder bedingt durch einen erhöhten Austausch von intrazellulärem Natrium

gegen extrazelluläres Calcium, oder auch durch eine Veränderung der Bindungskapazität des Sarkoplasmatischen Retikulums für Calcium, wie auch eine vermehrte Aufnahme des Calciums in Mitochondrien unter Energieverbrauch.

Nachdem unsere Versuchsbedingungen so gewählt wurden, daß auch in der Anoxie eine "Vita minima" mit einer reduzierten Kontraktionsleistung erhalten bleibt, ist es verständlich und war auch zu erwarten,daß die von anderen Autoren unter Anoxie bei hohen oxidativen Kontraktionsleistungen gefundenen Elektrolytverschiebungen sich in unseren Versuchen nicht zeigten. Unsere Gehaltsbestimmungen zeigen nach weitgehendem Auspressen der interstitiellen Flüssigkeit annähernd die Elektrolytgehalte im Muskelgewebe an, besagen aber nichts über die Fluxe und die freie verfügbare Calciumfraktion aus.

Untersuchungen über das Aktionspotential unter anaeroben Bedingungen liegen unter anderem von W.TRAUTWEIN und J. DUDEL (1956) vor, die eine ähnliche Abnahme der Kontraktionskraft unter Anoxie beobachteten bei gleichzeitiger Messung des Aktionspotentials. Ein direkter Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Aktionspotentials und der Kontraktionskraft war nicht ersichtlich, obwohl im Sauerstoffmangel eine Verkürzung des Aktionspotentials sichtbar war, mit einer später einsetzenden, geringgradigen Abnahme der Aktionspotentialamplitude, sowie einer Verkürzung der Kontraktionszeit bei zunehmender Erschlaffungszeit. Die beobachteten Veränderungen des Aktionspotentials

beschränkten sich im Wesentlichen auf eine Verkürzung des Plateaus. Da unter Sauerstoffmangel die Muskelzellen Kalium verlieren, führen die genannten Autoren den Plateauverlust auf eine Erhöhung der Permeabilität der Muskelfasern im Sauerstoffmangel mit einer Abnahme des Ruhepotentials zurück, so daß nach längerem Sauerstoffmangel dann als Folge ein quantitativ ins Gewicht fallender Kaliumverlust zu erwarten ist.
Diese Untersuchungen konnten von W.C.YANG (1963) gestützt werden, der auch bei Zusatz von 5,6 mM Glukose am spontanschlagenden Rattenvorhof in der Anaerobiose eine schnelle Abnahme der Kontraktionskraft bei einer verzögerten und geringeren Abnahme des Aktionspotentials beobachtete.

Vergleichbar mit den Untersuchungen von J.R.WILLIAMSON (1962), der eine Sättigung der anaeroben Glykolysegeschwindigkeit erst ab einer Glukosekonzentration von 10 mM beobachtete, sind die Befunde von T.F.McDONALD und D.P. MacLEOD (1973a + 1973b) am Meerschweinchenpapillarmuskel. Diese Autoren zeigten, daß bei 5 mM Glukose im Nährmedium die Aktionspotentialdauer in der Anoxie auf 30% des Normalwertes reduziert wird, bei 50 mM Glukose im Nährmedium 90% der Aktionspotentialdauer erhalten bleibt.
Bei einer suboptimalen anaeroben Glykolyse fanden oben genannte Autoren eine Abnahme der Aktionspotentialdauer und des Ruhepotentials. Bei Erhöhung der Glukosekonzentration auf 50 mM waren die Effekte reversibel, so daß eine mögliche Abhängigkeit der Regulationsmechanismen der Membranpermeabilität angenommen wird.

In älteren Arbeiten (J.L.WEBB und P.B.HOLLANDER 1956; W. TRAUTWEIN und J.DUDEL 1956; D.P.MacLEOD und K.PRASAD 1969) wird angenommen, daß die Veränderungen des Aktionspotentials und des Ruhepotentials durch einen beschleunigten Kaliumeinstrom bewirkt werden, jedoch wird heute durch Verwendung der "Voltage-clamp- technique" angenommen, daß die Repolarisation vorwiegend abhängig ist von einer zeitabhängigen Verminderung des langsamen und schnellen "inward current" und weniger von einem beschleunigten Kalium "outward current" (D.MARSCHER und K.PEPER 1969; G.W.BEELER und H.REUTER 1970; G.GIEBISCH und S.WIEDMANN 1971).

T.F.McDONALD et al. (1973b) postulieren, daß der "slow inward current" für Natrium und Calcium metabolisch beeinflußt werden kann. - Dieses wird deutlich an der Verkürzung der Aktionspotentialdauer mit einer früher einsetzenden Repolarisation.

Das Ruhepotential wird bei ausreichender Glukosekonzentration aufrecht erhalten, jedoch wird in der ersten Phase der Anoxie bei nicht maximal gesteigerter anaerober Glykolyse der langsame $Na^+/Ca^{++}$ - Kanal metabolisch beeinflußt (T.F.McDONALD et al. 1973 b) mit einer Verminderung des intrazellulären Calciums und einer folglichen Abnahme der anaeroben Kontraktionskraft. Nachdem die anaerobe Glykolyse maximal gesteigert ist, könnte das durch den "slow inward current" sich an der Innenseite der Membran ansammelnde Natrium dort Calcium labilisieren (H.LÜLLMANN und T.PETERS 1977), mit einer Zunahme der Kontraktionskraft. Mit einem calciumabhängigen Mechanismus wird die

treppenförmige positiv inotrope Wirkung von Herzglykosiden erklärt. In Übereinstimmung würde hier die synergistische positiv inotrope Wirkung von g-Strophanthin stehen, das ohne Steigerung der Glykolyse die anoxische Kontraktionskraft verdoppelt und die Anoxietoleranz verlängert. Für diese Hypothese fehlen jedoch Untersuchungen der Elektrolytfluxe.

Wichtig erscheint noch die Beobachtung von W.TRAUTWEIN und J.DUDEL (1956), daß beim Umschalten von Anoxie auf Normoxie ein Überschießen des Aktionspotentials auftrat; allerdings beobachteten diese Autoren keinen überschießenden Kontraktionspeak, den wir in allen Versuchen beobachten konnten.

### 4.2.5. Die reduzierte Kontraktionskraft in Anoxie

Aus unseren Versuchen wird am Anfang der Anaerobiose eine Zunahme der Kontraktionskraft deutlich, die auf eine Catecholaminfreisetzung zurückgeführt wird, da dieser Peak mit Pindolol unterdrückt werden konnte. Die in einzelnen Versuchen noch sichtbare kurzfristige Verbesserung und der sehr abgeschwächte positiv inotrope Effekt ist entweder Ausdruck einer nicht vollständigen ß-Blockade oder Ausdruck einer kurzfristigen erhöhten freien $Ca^{++}$-Konzentration als Folge veränderter Gleichgewichte der $Ca^{++}$-Fluxe aus verschiedenen Kompartimenten.

Die in der zweiten Phase des Anoxietestes auftretende starke Abnahme der Kontraktionskraft ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen.

a.) Abfall der energiereichen Phosphate.

Die ATP-Konzentration fällt zunächst verzögert ab, das aus CP wieder regeneriert wird. Bei verlängerter Anoxie reichen die dann schon abgesunkenen CP-Vorräte zur ATP-Rephosphorylierung nicht mehr aus.

b.) Anhäufung von Laktat.

Inwieweit das gebildete Laktat einen Einfluß auf die anaerobe Kontraktionskraft hat, wurde auch von anderen Autoren untersucht und folgendes postuliert:

1.) Verdrängung des $Ca^{++}$ an der Zellmembran, aus dem sarkoplasmatischem Retikulum oder an den Myofibrillen durch $H^{+}$-Ionen. (A.M.KATZ 1970; Y.NAKAMARU und A.SCHWARTZ 1970). Hiergegen steht die Hypothese von S.GUDBJARNASON et al. (1970) der eine Verdrängung des $Ca^{++}$ durch $H^{+}$ an den Myofibrillen für unmöglich hält, da das Creatinphosphat zur Base Creatin abgebaut wird, und somit das pH an den kontraktilen Proteinen weitestgehend unbeeinflußt bleibt. Dieses erscheint jedoch fragwürdig zu sein, zumal aus Creatinphosphat anorganisches Phosphat ($PO_4^{2-}$) frei wird und mit den $H^{+}$-Ionen Phosphorsäure bildet, die mit Sicherheit eine Veränderung des pH verursachen und die basische Wirkung des Creatins zumindest aufheben dürfte.

2.) Verminderte Myosin-ATPase-Aktivität (M.H.SCHADLER 1967)

3.) Veränderungen des Myocardmetabolismus und der Ener-

gieproduktion (L.H.OPIE 1965)

4.) Blockierung der endogenen Catecholamine (T.S. DARBY et al. 1960; K.WILDENTHAL et al. 1968; J.C. MARSIGLIA et al. 1973).

J.S.CRIE et al. (1976) postuliert, daß eine Acidose den inotropen Effekt der Catecholamine unterdrückt. Dieser Autor hält es für möglich, daß Laktat einen Einfluß auf die Aufnahme in oder die Freisetzung aus subzellulären Calciumspeichern hat. Ein Effekt auf die Catecholaminfreisetzung erscheint uns unwahrscheinlich, da bei Vorgabe eines ß-Blockers (Pindolol) nur der Peak am Anfang der Anoxie reduziert wird, zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3 jedoch wieder die beschriebene Erholungsphase mit einer Verbesserung der Kontraktionskraft unverändert beobachtet werden konnte.

Im Unterschied zu Occlusionsversuchen kann in unserem durchströmten Präparat das gebildete Laktat frei aus der Zelle ins Nährmedium abdiffundieren (F.GOTTDENKER und M.WACHSTEIN 1933). Da die von uns gefundenen Maximalkonzentrationen im µmolaren Bereich liegen, scheint eine Anhäufung des Laktats mit einer folgenden Verschiebung zur sauren Seite als Deutung der Abnahme der anaeroben Kontraktionskraft nur unwesentlich, zumal ja gerade bei der höchsten Laktatproduktion wieder eine positive Inotropie beobachtet wird.

Der Energiemangel, der sich vor allem in der Abnahme des Creatinphosphates äußert, ist mit aller Wahrscheinlichkeit

die wichtigste Ursache für die anoxische negative Inotropie. Die Verbesserung der anoxischen Kontraktionsleistung im Zusammenhang mit der anlaufenden Laktatproduktion spricht ebenfalls für die Bedeutung einer ausreichenden Energienachlieferung, welche über die nun wesentlich langsamer abfallenden ATP-Konzentrationen den kontraktilen Proteine noch ausreichend Energie zur Verfügung stellt. Daß bei einer stark herabgesetzten Creatinphosphatkonzentration (etwa 10% des normoxischen Wertes) ein Zeitfaktor für die Phosphorylierung des ATP an den kontraktilen Proteinen ausschlaggebend ist, erklärt die verbesserte Anoxietoleranz bei der sehr niederen Frequenz von 0,5 Hz.

### 4.2.6. Einwirkungen auf Kontraktionskraft und Stoffwechsel im Anoxietest.

#### 4.2.6.1. g-Strophanthin

g-Strophanthin erhöhte die anaerobe Kontraktionskraft im Mittel auf 219% des normoxischen Kontrollwertes (Abb. 21, 22 und 23). Nachträgliche Sauerstoffzufuhr zeigte, daß die anaerobe Kontraktionskraft etwa 50-60% des normoxischen Wertes bei dieser Frequenz entspricht.
Widererwarten führte eine solche Steigerung der Kontraktionskraft zu keinem signifikanten Abfall des ATP-Gehalts im Gewebe. Es wurde dabei sogar ein um 42,44% über den unbehandelten anoxischen Kontrollen erhöhter Creatinphosphatgehalt gemessen, doch war dieser Unterschied bei der großen Streuung und der geringen Anzahl von 6 Versuchen nicht statistisch zu sichern (Tabelle 14 und 17). Die Laktat-

produktion (Abb.32, Tabelle 8) liegt in der gleichen Größenordnung wie die der $N_2$-Kontrollen (-7%), so daß eine Steigerung der anaeroben Glykolyse als Folge einer Steigerung der Kontraktionsarbeit sicher auszuschließen ist. Daß g-Strophanthin die Glykolysegeschwindigkeit nicht steigert und auch an ruhenden Herzvorhöfen nicht verändert, zeigt, daß es in den anaeroben Stoffwechsel auch direkt nicht eingreift.

Betrachtet man nun in Abb.22, daß die gesteigerte anaerobe Kontraktionskraft wesentlich von 6,6 $\pm$ 1,55 auf 21,2 $\pm$ 3,3 Stunden verlängert ist, so bleibt als einzige Erklärungsmöglichkeit für die verbesserte und verlängerte Kontraktionsleistung unter Anoxie nur eine verbesserte Utilisation der Energie. Daß zum Zeitpunkt der stärksten Kontraktionsleistung die Creatinphosphatvorräte nicht weiter abgesunken, sondern im Gegenteil eher erhöht erschienen, würde dafür sprechen, daß die Rephosphorylierung über die cytoplasmatische Creatinkinase verbessert wird. Untersuchungen von W.TRAUTWEIN und J.DUDEL (1956) am Katzenpapillarmuskel in strenger Anoxie haben gezeigt, daß auch hier eine positiv inotrope Wirkung bei Erhöhung der Frequenz möglich ist (Treppenphänomen). Auch diese Autoren diskutieren eine verbesserte Utilisation der Energie, deren Mechanismus aber bis jetzt unbekannt ist.

4.2.6.2. Nicotinsäureamid

Nicotinsäureamid hat in einer sehr hohen Konzentration

von 20 mM unter Normoxie einen sehr deutlichen und anhaltenden positiv inotropen Effekt (H.MÖLLER, U.DELABAR und M.SIESS 1974). Es wird dabei an eine Hemmung der Phosphodiesterase gedacht (M.SHIMOYAMA, M.KAWAI, Y.HOSHI und I.UEDA 1972). Durch Zusatz von 20 mM Nicotinsäureamid ist keine signifikante Steigerung der Glykolyse (+5,42%) zu beobachten (Tab.8). Auch ist die positiv inotrope Wirkung mit keiner signifikanten Veränderung der Adeninnucleotidfraktion gegenüber der Stickstoffkontrolle in Zusammenhang zu bringen (Tab.14). Signifikant nimmt dagegen im Unterschied zu g-Strophanthin (+42,44%) hier der Creatinphosphatpool um 44,86% ab, wobei eine allerdings nicht signifikante Erhöhung des Creatins beobachtet wird ($\Delta$ % = + 11,82%, Tab.17). Dieses erscheint deshalb wichtig, weil meist eine Korrelation zwischen Creatinphosphatgehalt und kontraktiler Aktivität beobachtet wird, hier ist es sicher nicht der Fall. Ein Versuch, ob die Anoxietoleranz unter Nicotinsäureamid verlängert ist, wurde hier nicht durchgeführt. Es wäre hier interessant, ob bei dem gemessenen Wert von 10,57% Creatinphosphat im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen eine Verlängerung der Anoxietoleranz möglich ist. Weitere Beobachtungen anderer Autoren über Nicotinsäureamid zu dieser Frage liegen bis jetzt noch nicht vor.

4.2.6.3. Theophyllin

Die nachgewiesene positiv inotrope Wirkung des Theophyllins als Phosphodiesterasehemmer beruht sicher auch unter

Anoxie auf einem Anstieg des cAMP. Trotzdem ist auch hier unter Anoxie die Laktatproduktion nicht gesteigert. Eine erhöhte Glykogenolyse dürfte bei 15 mM exogener Glukose mit voll Sättigung auch keinen Effekt ausüben, da hier im besten Fall vermehrt endogenes Glykogen statt exogene Glukose verstoffwechselt wird.
Im Unterschied zu Nicotinsäureamid ist die positiv intrope Wirkung nach Zugabe von Theophyllin auch nicht anhaltend, so daß im Anoxietoleranztest (im Unterschied zu g-Strophanthin) eine Verlängerung der anaeroben Kontraktilität nicht eintreten dürfte. Eine Überprüfung steht jedoch noch aus.

4.2.6.4. Creatin

Aus unseren Versuchen, wie auch aus den Beschreibungen anderer Autoren, ist ersichtlich, daß das Creatinphosphat in der Anaerobiose als schnell verfügbarer Energiespender zu Creatin gespalten wird. Da Creatin die Muskelzelle, langsam verlassen kann und folglich nicht mehr zur Verfügung steht, um durch Creatinkinase wieder zu Creatinphosphat rephosphoryliert zu werden, erschien eine Zugabe von Creatin zum Nährmedium von besonderem Interesse.

Unter Normoxie (Abb.27a) zeigte sich auch eine signifikant geringere "Ermüdung" mit zunehmender Versuchsdauer. Dieser Befund, wie auch die Beobachtung, daß die Creatinphosphatkonzentration im Gewebe unter Normoxie gering und nicht signifikant erhöht erscheint, bei gleichzeitiger Abnahme der Creatinkonzentration (Abb.32), deutet auf eine Rephos-

phorylierung des Creatins hin. Das Ergebnis der Untersuchungen aus Abb.32 hat die gleiche Tendenz wie die Analysen aus Tabelle 17. Bei Zusatz von 1 mM Creatin zum Nährmedium unter Aerobiose wird ein um 23% erhöhter Creatinphosphatgehalt im Gewebe gemessen. Es erscheint möglich, daß dieser erhöhte Creatinphosphatgehalt in einem Zusammenhang steht mit der Ermüdungserscheinung. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist unter Normoxie die ATP-Fraktion um 16,01% erhöht (Tab.15). Gleichzeitig ist die ADP- und AMP-Konzentration erniedrigt (-19,73 bzw. -27,36%). Leider sind diese Werte nicht statistisch gesichert. Weiterführende Untersuchungen zur Verminderung der Ermüdung oder auf die Veränderungen des Creatinphosphatgehaltes sind in Langzeitversuchen nicht durchgeführt worden.

Unter Anaerobiose konnte keine Veränderung der anaeroben Kontraktionskraft durch Zusatz von 1 mM Creatin beobachtet werden (Abb.28/IIc). Der Creatinphosphatgehalt war im gleichen Bereich wie unter Normoxie gesteigert, gleichzeitig gesteigerter Creatingehalt ist wohl auf eine Veränderung des Konzentrationsgradienten zwischen Nährmedium und Muskelgewebe zurückzuführen. Der geringfügige erhöhte Wert der ATP-Fraktion war nicht signifikant. Inwieweit eine der Anoxie vorausgehende Inkubation mit Creatin einen positiven Effekt auf die Anoxietoleranz hat, wurde nicht untersucht. Jedoch ist es vorstellbar, daß durch die erhöhte Konzentration der energiereichen Phosphate die Überlebenszeit der Herzmuskelzellen verlängert ist mit einer verspäteten Aus-

bildung von kernnahen Vakuolen und Nekrosen (W.SCHMID und M.SIESS 1956). Dieses kann nur durch histologische Untersuchungen überprüft werden, die hier jedoch nicht durchgeführt wurden.

4.2.6.5. Glukose

Eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Nährmedium von 15 mM auf 30 mM verursachte im Anoxietest innerhalb der ersten Minuten eine nicht regelmässig eintretende Steigerung der Kontraktionskraft, die mit zunehmendem Versuchsverlauf wieder abfiel (Abb.28/IIb). Dies ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf eine Veränderung der Osmolarität der Nährlösung zurückzuführen. Die genannte positiv inotrope Wirkung ist mit keiner signifikanten Veränderung der Adeninnucleotidfraktion (Tab.14) oder des Creatinphosphates (Tab.17) in einem Zusammenhang zu bringen.
Die Laktatproduktion bei 30 mM Glukose im Nährmedium war nicht signifikant von den Kontrollen verschieden, da bei einem Angebot von 15 mM Glukose das Glukoseangebot mit Sicherheit keinen limitierenden Faktor der anaeroben Glykolysegeschwindigkeit mehr darstellt.

4.2.6.6. Ribose

Zugabe von 15 mM Ribose zum Nährmedium unter Anaerobiose führte nur zu einer kurzfristigen nichtsignifikanten Steigerung der Kontraktionskraft mit einem nachfolgenden schnelleren Abfall, so daß zum Zeitpunkt 3 kein signifikanter

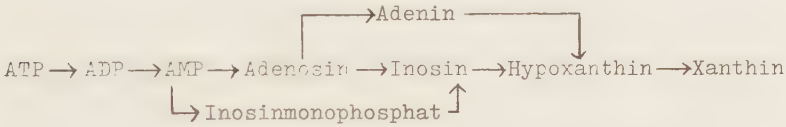
Unterschied mehr zu den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen werden konnte. Die Adeninnucleotidfraktion war geringfügig, aber nicht signifikant niedriger (+4,83%) bei gleichbleibender Creatinphosphatkonzentration. Die Laktatproduktion lag im Bereich der Streubreite der Kontrollen.

Die beobachtete positiv inotrope Wirkung ist mit aller Wahrscheinlichkeit, genau wie bei der Erhöhung der Glukosekonzentration (30 mM), auf eine Veränderung der Osmolarität der Nährlösung zurückzuführen und nicht auf eine Verbesserung der energetischen Verhältnisse, gemessen an der Konzentration der energiereichen Phosphate und der Glykolysegeschwindigkeit.

4.2.6.7. Adenin

In unseren Versuchen, wie auch in Untersuchungen anderer Autoren, ist in der Anaerobiose ein deutlicher Abfall der Adeninnucleotidfraktion zu beobachten, der primär vom Abfall der ATP-Fraktion beeinflußt wird, bei annähernd konstanten signifikant erhöhten ADP- und AMP-Konzentrationen. Das gebildete ADP wird durch Myokinase zu ATP und AMP umgewandelt, wobei das ATP dann zur Energiegewinnung zu ADP gespalten wird. Das AMP wird zu Inosinmonophosphat desaminiert (R.M.BERNE 1963). Am anoxischen Hundeherzen zeigten G.MICHAEL et al. 1959 einen Anstieg der anorganischen Phosphatkonzentration, der größer war als die Summe der Phosphatgruppen des ATP und Creatinphosphats. Die Erklärung hierfür wird in einem weiteren Abbau des Inosinmonophospha-

tes zu Inosin und Hypoxantin mit Freisetzung von anorganischem Phosphat gesehen (R.M.BERNE 1963). E.GERLACH und B. DEUTICKE (1963) dagegen postulieren, daß die Adeninnucleotide im Herzmuskel hauptsächlich über Adenosin abgebaut werden; der Weg über Inosinmonophosphat stellt im Herzmuskel nur einen Nebenweg dar im Vergleich zum Skelettmuskel, so daß der Abbau des ATP wie folgt dargestellt werden kann:




Da Adenin das Gewebe schnell verlassen kann, war es nun von großem Interesse, den Effekt von Adenin im Anoxietest und unter Normoxie zu untersuchen, da anzunehmen war, daß Adenin rasch von außen in die Zelle reindiffundiert.
Zugabe von 0,1 mM Adenin unter Normoxie verursachte in unseren Versuchen innerhalb von 10 Minuten eine signifikante Steigerung der Kontraktionskraft auf 109,47% des Ausgangswertes. Diese gesteigerte Kontraktilität fiel als Folge der Ermüdung langsam ab, jedoch lag nach einer Stunde die Kontraktionskraft unter 0,1 mM Adenin immer noch signifikant über den Kontrollen (Abb.27b). Die ATP-Fraktion lag bei Zusatz von 0,1 mM Adenin zum Nährmedium nicht signifikant 15,91% über den Kontrollen, bei einer verringerten aber nicht signifikanten ADP- und AMP-Konzentration. Die um 23,78% höhere Creatinphosphatkonzentration und gleichzeitig

um 45% niedrigere Creatinkonzentration, deren Veränderungen nicht statistisch zu sichern waren, spricht für eine Verbesserung der Energielage ähnlich wie bei den Adeninnucleotiden. Y.SUIGITA und E.R.SIMON (1964) beschreiben eine Erhöhung der ATP-Fraktion bei Zugabe von Adenin in Kombination mit Inosin bei Blutkonserven. Aus den oben genannten Untersuchungen erscheint es möglich, daß auch in unserem Präparat ein Teil des AMP über das Inosinmonophosphat zu Inosin abgebaut wird, auch wenn dieser Abbauweg laut E. GERLACH et al. nur einen Nebenweg darstellt.

Untersuchungen von D.H.NAMM (1973) zeigten, daß am Rattenmyocard (Langendorfpräparat, Normoxie bei 35°C) bei Zusatz von 0,05 µM Adenin zum Nährmedium 63,8% des Adenins in Form von ATP im Gewebe wiedergewonnen werden konnte. Die Menge von 1,6 nMol entsprach jedoch weniger als 0,1% der Gesamt-ATP-Konzentration im Gewebe. Ein Teil des Adenins konnte als ADP und AMP wiedergewonnen werden. Zunehmende Adeninkonzentrationen bewirkten einen erhöhten Einbau; bei 4,5 µM Adenin im Nährmedium wurden etwa 6,0 nMol als Adeninnucleotid wieder gefunden.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß eine Zugabe von Adenin eine fortgeschrittene Ermüdung des Präparates unter Normoxie durch die positiv inotrope Wirkung vermeiden kann. Inwieweit dieser Effekt auf einer Verbesserung der energiereichen Phosphatkonzentration beruht, kann vorläufig nicht beurteilt werden. Zugabe von 0,1 mM Adenin im Anoxietest verursachte auch hier innerhalb der ersten 10 Minuten eine

signifikante Steigerung der Kontraktionskraft (Abb.28/Ib), die jedoch bei zunehmender Versuchsdauer stärker abnahm als die entsprechenden Kontrollen.
Die ATP-Fraktion war zum Zeitpunkt 3 signifikant um 71,91% höher als die entsprechenden anaeroben Kontrollen und lag im Bereich der erhöhten Werte unter Normoxie bei Zusatz von 0,1 mM Adenin. Die ADP-Fraktion war unter Anaerobiose bei Zusatz von 0,1 mM Adenin signifikant um 71,32% angestiegen, bei einer nur gering erhöhten AMP-Konzentration (+12,41%) (Tab.14,15,17). Interessanterweise konnten wir unter Anaerobiose bei Zusatz von Adenin zum Nährmedium einen signifikant erhöhten Creatinphosphatgehalt beobachten (+46,07%), bei einem unveränderten Creatingehalt. Die Laktatproduktion unterschied sich nicht von den Kontrollen.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß Zusatz von Adenin zum Nährmedium auch unter Anaerobiose eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen der energiereichen Phosphate verursacht. Inwieweit dieser Befund eine Erklärung für die geringfügig verbesserte Kontraktionsleistung darstellt, kann aus unseren Versuchen direkt nicht gesagt werden. Aus Untersuchungen anderer Autoren ist bekannt, daß ein erhöhter Pool an ernergiereichen Phosphaten eine Verbesserung der Anoxietoleranz mit sich bringt. Der erhöhte Pool an energiereichen Phosphaten resultiert sicher nicht aus einer gesteigerten anaeroben Glykolyse, zumal auch an ruhenden, unbelasteten Herzvorhöfen die anaerobe Glykolyse durch Adenin nicht gesteigert wurde. Auch hier konnte ein gesteigerter, energiereicher Phosphatpool nachgewiesen werden.

4.2.6.8. Adenin + Ribose

Aus den Untersuchungen von D.H.NAMM (1973) am isolierten Rattenherz wird deutlich, daß Adenosin drei- bis fünfmal schneller als Adenin im Adeninnucleotidpool eingebaut wird, jedoch bereits bei Konzentrationen höher als 20 µM negativ inotrope Wirkungen zeigt.
M.I.JACOB und R.M.BERNE (1960) beobachteten eine Adeninnucleotidbildung aus angebotenem Adenosin; 1,6 bis 5,4 µM wurden im Gewebe als Adeninnucleotid wiedergefunden, der Rest als Inosin und Hypoxanthin in der Nährlösung und im Gewebe. Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, daß Adenosin nur in sehr niederen Konzentrationen verwendet werden kann, wenn seine negativ inotrope Wirkung vermieden werden soll. Aus diesem Grunde wählten wir die Kombination von 0,1 mM Adenin + 15 mM Ribose.

Unter Normoxie konnten wir innerhalb der ersten 10 Minuten eine signifikante Steigerung der Kontraktionskraft auf 173,76% beobachten, die jedoch als Folge der Ermüdung rasch abnahm (Abb.27c). Bei Betrachtung der Abb.27b und 27c fällt auf, daß die Ermüdung bei Zusatz von Adenin + Ribose wesentlich stärker ist, als bei den Kontrollen oder auch bei Zusatz von 0,1 mM Adenin allein. Es erscheint, daß durch die zusätzlichen 15 mM Ribose, mit einer folglichen Veränderung der Osmolarität der Nährlösung, die Kontraktionskraft kurz nach Zugabe einen summierenden Effekt von Adenin oder Ribose gesondert darstellt. Da diese Steigerung der Kontraktionskraft durch Ribose, ähnlich wie bei

Zusatz von Glukose, nur von kurzer Dauer ist, von Adenin aber ein lang anhaltender Effekt ist, ist diese "beschleunigte Ermüdung" erklärbar. Dieses wird besonders deutlich zum Zeitpunkt 3; die Kontraktionskraft bei Zusatz von Adenin + Ribose ist vergleichbar mit dem Wert bei Zusatz von Adenin zum Nährmedium allein.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei Inkubation mit 0,1 mM Adenin allein konnte hier eine signifikante Zunahme der ATP-Fraktion um 50,06% beobachtet werden, bei einer geringfügig verminderten ADP- und AMP-Konzentration (-4,88% bzw. -12.26% (Tab.15). Die Creatinphosphat- und Creatinkonzentration lagen innerhalb der Streubreite der Kontrollen.
Im Vergleich mit den Untersuchungen unter Normoxie und Adenin erscheint bei Inkubation mit Adenin + Ribose der Effekt auf die Kontraktionskraft und energiereichen Phosphate vorwiegend durch das Adenin allein verursacht zu sein.

Adenin + Ribose verursachten im Anoxietest innerhalb von 10 Minuten eine starke, positiv inotrope Wirkung, so daß die anaerobe Kontraktionskraft ca 60% über dem Ausgangswert unter Normoxie lag (Abb.28/Ic). Die anaerobe positive Intoropie erscheint wieder ein summierender Effekt von Adenin oder Ribose allein zu sein. Die Ursache dieser Steigerung ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf verschiedene Wirkungsmechanismen zurückzuführen. Mit zunehmender Versuchsdauer nahm diese gesteigerte Kontraktionskraft

infolge der Ermüdung und eines nachlassenden positiv inotropen Effektes der Ribose stärker ab, als bei den entsprechenden Kontrollen. Jedoch war nach einer Stunde zum Zeitpunkt 3 immer noch eine signifikant höhere Kontraktionskraft nachweisbar.
Die biochemischen Analysen zeigten auch unter Anoxie eine signifikant erhöhte ATP-Fraktion bei einer erhöhten ADP-Fraktion, die bei der großen Streubreite und der geringen Versuchszahl (n=6) allerdings nicht signifikant war. Die Creatinphosphatkonzentration war nicht signifikant reduziert (Tab.17). Die Laktatproduktion war identisch mit den Kontrollen (Tab.8), so daß die gesteigerte Kontraktionskraft nicht aus einer verbesserten Energiebildung resultieren kann. Dieses zeigen auch die Untersuchungen an ruhenden, unbelasteten Herzvorhöfen. Zusatz von Adenin oder Ribose wie auch der Kombination von Adenin mit Ribose verursachten keine signifikante Veränderung der Glykolysegeschwindigkeit.

Eine Erklärung für die anaerobe Kontraktionskraftsteigerung wäre eine signifikante Zunahme der ATP-Fraktion (Adenin + Ribose) wie auch der Creatinphosphatkonzentration als Folge einer besseren Phosphorylierung (Versuche mit Adenin). Dieses erscheint jedoch zweifelhaft, da die Kontraktionssteigerung unmittelbar nach der Zugabe eintritt. In dieser kurzen Zeit ist mit aller Wahrscheinlichkeit noch keine Veränderung der energiereichen Phosphatkonzentration eingetreten, zumal ja Energie zur Bildung benötigt wird. Wahr-

scheinlich beruht die sofort einsetzenden Kontraktionskraftsteigerung auf einer Veränderung des pH Wertes. Adenin und auch Creatin sind Basen, die einer Säuerung des Gewebes als Folge der Laktatproduktion entgegen wirken und die elektromechanische Koppelung verbessert, da weniger $Ca^{++}$-Ionen durch $H^{+}$-Ione verdrängt werden. Diese mögliche pH-Veränderung könnte auch die Steigerung der Kontraktionskraft unter Normoxie (bei Adenin) und die verminderte Ermüdung (bei Creatin) erklären, da die auch unter Normoxie unterversorgten Innenzonen sauer werden (vgl.4.1.).
Die sofort einsetzende Steigerung der Kontraktionskraft ist möglicherweise Folge einer intrazellulären pH-Veränderung, während die Aufrechterhaltung energetisch durch eine Veränderung der energiereichen Phosphatkonzentration verursacht wird. Auffallend ist immerhin, daß auch aus der geringen Energielieferung der anaeroben Glykolyse noch eine Erhöhung des gesamten Adeninpools möglich ist, der sich vielleicht auch auf eine Erhöhung des Creatinpools auswirkt, während bei gleicher Energieproduktion ohne Erhöhung des angebotenen Adenins kein höherer Adeninnucleotidpool beobachtet wird. Aus diesem Grund muß daran gedacht werden, daß der Abbau des ATPs durch Adenin verlangsamt wird und auch der Austritt der Metaboliten aus der Zelle gehemmt wird.

4.2.6.9. Carbochromen (Intensain$^{R}$) und Na-Decanoat.

Nachdem von E.SCHRAVEN (1976) festgestellt worden war, daß

Carbochromen die Aufnahme der langkettigen Palmitinsäure in die Herzzelle hemmt, dagegen die Aufnahme von Glukose eher gefördert wird, erschien es interessant, inwieweit Carbochromen funktionell im Anoxietest bei Anwesenheit von 15 mM Glukose und Zugabe der kurzkettigen Fettsäure Decanoat die Kontraktionskraft beeinflußt. Nach vorliegenden Untersuchungen (B.D.OSTHEIM 1972; K.SÜßKAND 1976; M.SIESS et al. 1970; M.SIESS 1977) haben Fettsäuren im Konzentrationsbereich von 0,1 mM bis 2,0 mM negativ inotrope Wirkungen auf die Kontraktionskraft. Bei kurzkettigen Fettsäuren von $C_1$-$C_{10}$ ist eine Abhängigkeit der negativen Inotropie von der Länge der Kette festzustellen, die bereits ab 0,2 mM deutlich wird. Fettsäuren diffundieren wegen ihrer Lipidlöslichkeit und können vermutlich die $Ca^{++}$-Konzentration im Cytoplasma beeinflussen, sofern sie nicht über Co-Enzym-A in die Oxidationskette eingeschleust oder mit Triglyceriden zu Neutralfetten verestert werden. Da in der Aerobiose Fettsäuren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose bei entsprechenden Konzentrationen bevorzugt verbrannt werden, war anzunehmen, daß die negativ inotropen Effekte in der Anoxie, bei der freie Fettsäuren nicht mehr oxidiert werden, empfindlicher hervortreten. Wenn Carbochromen den Eintritt von freien Fettsäuren in die Zellen hemmt, muß dabei eine mindestens teilweise Aufhebung der negativ inotropen Wirkung zu erzielen sein.

Tatsächlich geht aus den Versuchen hervor, daß die negativ inotrope Wirkung von Na-Decanoat in Anoxie gegenüber Aerobiose geringfügig verstärkt ist und tatsächlich bis zu

einem gewissen Grad durch Carbochromen aufgehoben werden kann. $1x10^{-5}$g/ml Carbochromen wirkten bereits in Anoxie positiv inotrop.Durch 0,1 mM bis 0,2 mM Na-Decanoat werden deutlich sichtbare negativ inotrope Effekte erzielt wie ohne Vorgabe von Carbochromen, so daß eine Hemmung des Eintritts von freien Fettsäuren durch Carbochromen in die Zelle bei Anoxie unwahrscheinlich ist. Dieses wird noch dadurch bekräftigt, daß Carbochromen in einer Konzentration von $1x10^{-5}$g/ml bis $5x10^{-5}$g/ml auch ohne Zusatz von freien Fettsäuren ausgeprägte, positiv inotrope Wirkungen, in Normoxie und Anoxie bei ausschließlicher Inkubation von 15 mM Glukose, ausübt.

Über den Wirkungsmechanismus von Carbochromen ist weiter nichts bekannt. Laktat und die energiereichen Phosphate im Gewebe wurden nicht untersucht.

### 4.2.7. Anaerobe Energiegewinnung

Aus der anaeroben Glykolyse wird pro Mol Glukose nur 5% der Menge ATP gewonnen, die bei der gleichen Menge Glukose aus der aeroben Glukoseoxidation gewonnen wird. Nun tritt als Folge des Pasteureffektes in Anoxie eine Steigerung des Glukoseverbrauches pro Zeiteinheit ein, so daß in unseren Versuchen, zum Zeitpunkt der maximalen Laktatproduktion/Stunde zwischen der ersten und zweiten Stunde des Anoxietestes, die Energiebildung nur auf 48% des normoxischen Kontrollwertes abgefallen ist. Das entspricht einer Steigerung des Glukoseverbrauches um den Faktor 6,52. Beim

Umschalten von aeroben auf anaeroben Stoffwechsel werden aber sicher in den ersten Minuten Werte von 5% erreicht werden. Da die Steigerung des Glukoseverbrauches, gemessen an der Laktatproduktion, innerhalb der ersten 20 Minuten der Anoxie nur den Faktor 1,57 erreicht mit entsprechend geringerem Energiegewinn gegenüber der 6,87-fachen Steigerung des Glukoseverbrauches, wird verständlich, daß zuerst das Creatinphosphat, sehr stark abfällt.
Der ATP-Umsatz ergibt im Anoxietest gegenüber der Berechnung der Energiebilanz aus Laktatproduktion und Glukoseoxidation keine signifikanten Änderungen. Dieses ist verständlich, da die ATP-Konzentration im Gewebe im Vergleich zur ATP-Produktion sehr klein ist. Ohne Berücksichtigung des Creatinphosphates wird bei der Glukoseoxidation das Gesamt-ATP in ruhenden Herzvorhöfen in etwa 22,69 Sekunden einmal umgesetzt, an schlagenden Herzvorhöfen in 19,95 Sekunden. Bei den Bedingungen der anaeroben Glykolyse betragen die Umsatzzeiten bei ruhenden Herzvorhöfen 77,89 Sekunden, bei schlagenden jedoch 29,26 Sekunden, wobei der verringerte ATP-Gehalt in der zweiten Stunde Anoxie zugrunde gelegt wurde. Die Werte sind ohne Einbeziehung des Creatinphosphats berechnet und sollen nur ein Bild über die Größe der Umsatzgeschwindigkeit unter den genannten Bedingungen geben. Über die Umsatzgeschwindigkeit in den einzelnen Kompartimenten, z.B. an den kontraktilen Proteinen, kann aus der Gesamtumsatzgeschwindigkeit nichts ausgesagt werden. Bemerkenswert ist, daß die Umsatzgeschwindigkeit der schlagenden Herzvorhöfe unter Anaerobiose vergleich-

bar ist mit der Umsatzgeschwindigkeit der normoxischen Kontrollen. Dieses deutet auf eine ausreichende ATP-Gewinnung aus der anaeroben Glykolyse hin.

Verständlich wird daraus der beobachtete stärkere Abfall der Creatinphosphatkonzentration bei Hemmung der Energielieferung aus ATP und gleichzeitig fortlaufender Übertragung der Energie über die Creatinkinase auf die 5% bis 10% des an den kontraktilen Elementen kompartimentierten ATPS.

4.2.8. Die Energiebilanz berechnet aus der ATP-Bildung bei aerober Glukoseoxidation und anaerober Glykolyse bei 35°C und 0,5 Hz.

Zur Beurteilung der Energiegewinnung aus der anaeroben Glykolyse im Anoxietest sind Vergleiche von Sauerstoffverbrauch und Kontraktionsleistung sehr aufschlußreich. Man erkennt dabei, daß ohne Abwarten der Ermüdungserscheinung die Kontraktionskraft bei 0,5 Hz 35%, der bei einer Frequenz von 1,5 Hz erreichten maximalen Kontraktionskraft pro Schlag beträgt. Der Maximaleffekt der Kontraktionsleistung pro Stunde wird bei 4,0 Hz erzielt. Im Vergleich dazu beträgt die bei 0,5 Hz gemessene Leistung nur noch 5%. Es wird damit verständlich, daß unter Einrechnung des Ruhesauerstoffverbrauches bei 0,5 Hz der für diese Mehrarbeit benötigte zusätzliche Sauerstoff 10,61% des Ruhesauerstoffverbrauches beträgt, während bis zum Maximum bei einer Frequenz von 4,0 Hz der Sauerstoffmehrverbrauch 238,61% des Ruhebedarfs beträgt. Hieraus zeigt sich

schon sehr deutlich der Grad der auch unter Normoxie reduzierten Kontraktionsleistung bei 0,5 Hz. Der Nutzeffekt ist daher hier bei Einbezug des Ruhesauerstoffverbrauches sehr niedrig. Bezogen auf den für diese Kontraktionsleistung benötigten Sauerstoffbedarf ist in unseren Versuchen eine fast konstante Höhe des Nutzeffektes zu beobachten, d.h. pro Mol Sauerstoff wird bis zu einer Frequenz von 2,0 Hz eine annähernd konstante Leistung erbracht. Erst dann scheint dieser Wert stetig bei weiterer Frequenzerhöhung abzunehmen und erreicht bei 4,5 Hz den niedrigsten gemessenen Wert. Bei der relativ großen Streubreite ist aber der Unterschied zwischen dem Maximum und dem Minimum mit einem $P > 0,7$ nicht signifikant. Auffallend ist aber die fortlaufende Tendenz dieser Abnahme, die anzeigt, daß die Herzarbeit bei einer Frequenzerhöhung von 2,0 Hz auf 4,5 Hz zunehmend unökonomischer wird.
Berechnungen über die Kontraktionsarbeit und die Energiegewinnung wurden wiederholt durchgeführt (H.J.BRETSCHNEIDER 1956). Unsere Untersuchungen an isolierten Herzvorhöfen sind, schon durch den früher beschriebenen geringeren Nutzeffekt der Kontraktionsleistung isolierter Präparate, gegenüber der Berechnung am Gesamtorganismus nur schwer vergleichbar.

Die Energiebilanz aus den Meßwerten bei ruhenden und schlagenden Herzvorhöfen bei stark reduzierter Kontraktionsleistung, in Aerobiose und Anaerobiose zeigt, daß an ruhenden Herzvorhöfen aus der anaeroben Glykolyse nur 21,43% des aerob gebildeten ATP gewonnen wird. Dieses bedeutet

einen rund 4-fach höheren Wert, als sich aus dem Vergleich zwischen ATP-Gewinnung aus der Oxidation von Glukose und der anaeroben Glykolyse errechnen läßt. Dieses kann durch eine Steigerung der anaeroben Glykolyse als Folge des Pasteureffektes erklärt werden. Tatsächlich ist der anaerobe Glukoseverbrauch an ruhenden Herzvorhöfen um das 2,78-fache verglichen mit der Glukoseoxidation, gesteigert. Die Berechnung bei der reduzierten Kontraktionsleistung an elektrisch gereizten Herzvorhöfen ergab überraschend, daß hierbei 48,13%, also fast die Hälfte des unter aeroben Bedingungen gewonnenen ATPs gebildet wird. Dies ist das Doppelte gegenüber dem Wert der ruhenden Herzvorhöfe. Tatsächlich steigert sich als Folge der Kontraktionsarbeit der Glukoseverbrauch in der anaeroben Glykolyse um das 6,52-fache gegenüber dem Glukoseverbrauch durch Oxidation. Dabei wird eine maximale Grenze der Laktatproduktion erreicht, die bis jetzt durch keine der untersuchten Einwirkungen überschritten werden konnte. Damit stellt also diese maximale Glykolysesteigerung die energetische Grenze für eine reduzierte Kontraktionsleistung dar, die hinsichtlich der Kontraktionsamplitude zwar bis zu 60% des normoxischen Maximalwertes bei dieser Frequenz gesteigert werden kann (Abb.21 + 22, g-Strophanthin), ohne daß dabei die Laktatproduktion gesteigert wird. Daß hier echte koppelnde Effekte vorliegen, beweißt die erhöhte Anoxietoleranz. Man muß sich jedoch immer vor Augen halten, daß auch diese maximale anoxische Kontraktionsleistung nur etwa 5% bis 10% der durch Frequenzsteigerung erzielbaren Kontraktionsleistung

in Anaerobiose darstellt.

Die Untersuchungen zeigen, daß es auch beim Warmblüterherz in Anoxie möglich ist, eine wenn auch stark reduzierte Kontraktionskraft über Stunden aufrecht zu erhalten. Ausschlaggebend hierfür ist ein ausbalanziertes Verhältnis zwischen anaerober Glykolyse und reduzierter Kontraktionsleistung. Dieses wurde vor allem durch drastische Frequenzherabsetzung erreicht. Zum Froschherzen (Kaltblüter) bestehen insofern deutliche Unterschiede, da trotz der langsamen Eigenfrequenz in Anoxie keine verminderte Kontraktionsarbeit beobachtet wird, sodaß hier andere Enzymaktivitäten im anaeroben Energiestoffwechsel wie auch bei der Übertragung der Energie in den Kontraktionszyklus angenommen werden müssen.

## 5. Zusammenfassung

5.1. An isolierten ruhenden und elektrisch gereizten linken Herzvorhöfen von Meerschweinchen, inkubiert in Krebs-Henseleitlösung mit 15 mM Glukose (pH7,4), wird das Verhalten der Kontraktionskraft in Normoxie (95% $O_2$ / 5% $CO_2$) und Anoxie (95% $N_2$ / 5% $CO_2$) bei 25°C, 30°C, 35°C und 38,5°C bei einer Schlagfolge von 0,5 bis 5,0 Hz geprüft.

5.2. In Normoxie steigt entsprechend der Kraft-Frequenzbeziehung die Kontraktionskraft mit zunehmender Frequenz bis zu einem Maximum an. Bei 35°C und 0,5 Hz wird 20 bis 35% der mit 1,5 Hz erzielten maximalen Kontraktionskraft beobachtet. Bei 25°C liegt als Folge der "Kälteinotropie" die Kontraktionskraft bei niederen Frequenzen höher und das Maximum wird entsprechend bei 1,25 Hz beobachtet gegenüber 2,0 Hz bei 35°C und 5,0 Hz bei 38,5°C.

5.3. Innerhalb der ersten 3 bis 4 Stunden fällt die Kontraktionskraft in Abhängigkeit von Temperatur und Frequenz ab. Bei 35°C und 0,5 Hz wird auch nach dieser Zeit nur etwa 20% der initialen Kontraktionskraft als Folge dieser "Ermüdung" gemessen. Bei hoher Frequenz (5,0 Hz bei 38,5°C) ist die Ermüdung signifikant geringer (45% des Initialwertes).

5.4. Die Anoxietoleranz - gemessen an der Zeitdauer vom Beginn der Anoxie bis zum Erlöschen der registrierbaren Kontraktionskraft ist bei 0,5 Hz und 35°C am größten verglichen mit 25°C, 30°C und 38,5°C. Sie nimmt ab mit höheren

Frequenzen und niederen Temperaturen. Wiederholung der Anoxiephasen bis zum Stillstand bei verschiedenen Frequenzen und Verlängerung der Versuchsdauer verkürzt die Anoxietoleranz der Einzelwerte, auch wenn eine aerobe Erholungsphase von einer Stunde zwischen zwei Erstickungsphasen gelegt wird.

5.5. Bei 35°C und 0,5 Hz wird nach einer Stunde Normoxie und einmaliger Anoxie eine Anoxietoleranz von 6,6 ± 1,55 Stunden (n=8) beobachtet.

5.6. Als Anoxietest wird funktionell und biochemisch der Verlauf der ersten zwei Stunden Anoxie bei 35°C und 0,5 Hz analysiert.

a.) Sofort nach dem Umschalten von Normoxie auf Anoxie wird in Form eines Peaks eine kurze positive inotrope Wirkung beobachtet, die auf eine Catecholaminfreisetzung zurückgeführt wird, da dieser Effekt durch ß-Blocker (Pindolol) unterdrückt werden kann.

b.) Es folgt eine Phase zunehmender negativ inotroper Wirkung, die nach 15 bis 20 Minuten mit etwa 20% des normoxischen Wertes ihren Tiefpunkt erreicht, dann bis zur ersten Stunde Anoxie auf 50% bis 80% ansteigt, und während der zweiten Stunde Anoxie ein Plateau beibehält. Paradoxerweise liegen hier die aeroben Kontrollwerte, als "Ermüdungseffekt", unter der anoxischen Kontraktionskraft.

c.) Umschalten nach zwei Stunden Anoxie auf Normoxie führt

zu einem peakförmigem Überschießen der Kontraktionskraft auf 450% des normoxischen Initialwertes, der rasch auf die normoxische "Ermüdungsphase" absinkt.

d.) Die Laktatproduktion beträgt in den ersten 20 Minuten Anoxie 9,09 µMol/h x 100 mg Feuchtgewicht. Sie nimmt dann rasch zu und erreicht zwischen der ersten und der zweiten Stunde Anoxie ein Plateau mit ca. 14 µMol /h x 100 mg Feuchtgewicht. In ruhenden Herzvorhöfen ist bei 50% niederen Werten eine ähnliche Anlaufphase der Laktatproduktion zu einem Maximum zu beobachten.

e.) Die Elektrolytverschiebungen deuten in Anoxie einen geringen $Na^+$ Anstieg mit entprechendem $K^+$ Verlust an, der letztere ist nach Umschalten auf Normoxie reversibel. $Ca^{++}$ scheint zuerst abzunehmen und in der ersten Stunde Anoxie, sowie auch in der ersten Phase nach Einsetzen der Normoxie wieder anzusteigen. Die Unterschiede sind nicht statistisch gesichert.

f.) In den ersten 20 Minuten fällt Creatinphosphat auf ca. 22,88%,ATP auf 83,09% der normoxischen Werte ab, mit entsprechendem Anstieg der Creatin- bzw. ADP- und AMP-Konzentration. Danach ist der weitere Abfall beider energiereicher Phsophate verlangsamt. Nach zwei Stunden Anoxie ist noch 9,03% Creatinphosphat und 72,63% ATP des normoxischen Kontrollwertes vorhanden. Der Creatinpool und Adeninnucleotidpool nehmen zwischen Meßpunkt 2 und Meßpunkt 3 auf 79,33% bzw. 73,19% des normoxischen Initialwertes ab.

5.7. Energetische Vergleichsmessungen in Normoxie bei 35°C und Messung der Kontraktionsarbeit pro Schlag und des Sauerstoffverbrauches bei verschiedenen Frequenzen ergaben:

a.) Bei 0,5 Hz beträgt die Kontraktionsleistung (ohne Ermüdungseffekt) etwa 5% des bei 5,0 Hz erzielten Maximalwertes. Die Kontraktionskraft pro Schlag beträgt etwa 35% des Maximalwertes, der bei 2,0 Hz erzielt wird.

b.) Der Sauerstoffverbrauch liegt bei 0,5 Hz ca 10% über dem Ruhesauerstoffverbrauch (5,10 $\pm$ 0,18 u Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht).

c.) Der Sauerstoffverbrauch liegt bei 4,5 Hz ca 364,43% über dem Ruhesauerstoffverbrauch (18,80 $\pm$ 0,90 u Mol/h x 100 mg Feuchtgewicht).

Mit Einbezug des Ruhesauerstoffverbrauches (Bruttosauerstoffverbrauch) ist der Nutzeffekt der Kontraktionsarbeit bei 0,5 Hz am niedrigsten. Ohne Ruhesauerstoffverbrauch (Nettosauerstoffverbrauch liegt er in der Streubreite der Werte bei 1 bis 1,5 Hz. Mit zunehmender Frequenz scheint er kontinnuierlich abzunehmen.

5.8. Ein Vergleich zwischen Aerobiose und Anaerobiose bei 35°C ergibt:

a.) Am ruhenden Herzvorhof steigt der Glukoseverbrauch in Anoxie um das 2,78-fache, an schlagenden Herzvorhöfen um das 6,52-fache (Pasteureffekt).

b.) Damit kann an schlagenden Herzvorhöfen rund 48% der aeroben Energie durch die anaerobe Glykolyse gedeckt

werden, bei ruhenden Herzvorhöfen wird rund 21% gedeckt.

c.) Die Umsatzgeschwindigkeit für den Gesamt-ATP-Pool ohne Einbezug des Creatinphosphats beträgt in Aerobiose 22,3 Sekunden, in Anaerobiose 29,3 Sekunden.

5.9. Mit g-Strophanthin konnte im Anoxietest die Kontraktionskraft auf über 200% des normoxischen Intitialwertes gesteigert werden. Dieses entspricht etwa 60% des normoxischen Wertes unter g-Strophanthin bei gleicher Frequenz von 0,5 Hz. Diese Kontraktionssteigerung hatte keinen signifikanten Einfluß auf die energiereiche Phosphatkonzentration oder die Laktatproduktion. Die Anoxietoleranz konnte mit g-Strophanthin von 6,6 $\pm$ 1,55 Stunden auf 21,2 $\pm$ 3,3 Stunden signifikant ausgedehnt werden.

5.10. Positiv inotrope Wirkungen im Anoxietest wurden weiterhin erzielt mit:

a.) Theophyllin; Kurzfristige positiv inotrope Wirkung, ohne Beeinflussung der energiereichen Phosphate.

b.) Nicotinsäureamid; Anhaltende positiv inotrope Wirkung mit signifikanter Abnahme der Creatinphosphatkonzentration ($\Delta$% = - 44,86%)

c.) Adenin; Anhaltend positiv inotrope Wirkung mit signifikant erhöhtem Creatinphosphatgehalt und ATP-Gehalt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Inkubation mit Adenin + Ribose beobachtet.

Eine Beeinflussung der Laktatproduktion konnte mit keiner der untersuchten Substanzen beobachtet werden, auch Er-

höhung der Glukosekonzentration auf 30 mM oder Zusatz von Ribose hatten keinen Effekt auf die Laktatproduktion.

d.) Carbochromen: Mit oder ohne Zusatz von Na-Decanoat, das selber negativ inotrop wirkt. Ein Hemmeffekt von Carbochromen auf die Aufnahme der $C_{10}$Fettsäuren in die Herzmuskelzelle konnte durch die funktionellen Beobachtungen nicht nachgeprüft werden.

5.11. Der Ermüdungseffekt unter Normoxie konnte beeinflußt werden durch:

a.) Zusatz von Creatin: Verzögerung der Ermüdung ohne positiv inotropen Effekt.

b.) Zusatz von Adenin mit oder ohne Kombination von Ribose: der positiv inotropen Effekt verursachte eine verzögerte Ermüdung bei einer signifikanten Steigerung des Adeninnucleotidpools.

5.12. Die Frage der Energiebilanz und der elektromechanischen Koppelung in Normoxie und Anoxie wird an Hand der Befunde diskutiert.

LEBENSLAUF

Am 29. Februar 1948 wurde ich, Heiner Ingo Seifart, in Windhoek Südwest Afrika als Sohn des Kaufmanns Heinrich Seifart und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Pingel geboren. Von Januar 1954 bis Dezember 1966 besuchte ich die Deutsche Höhere Privatschule in Windhoek. Nach einem weiteren Jahr legte ich an der Windhoek Hoerskool im Dezember 1967 die Reifeprüfung ab.

Im Jahre 1968 begann ich an der Universität Potchefstroom/ Südafrika das Pharmaziestudium mit Abschluß des ersten Teils im November des gleichen Jahres.

Im Januar 1969 begann ich meine Tätigkeit als Apothekerpraktikant in der Luisen Apotheke in Windhoek.

Von Januar 1971 bis November war ich als Pharmaziestudent an der Universität Potchefstroom/Südafrika immatrikuliert wo ich am 23.11.1972 das Staatsexamen ablegte und am 6.12.1972 die Approbation als Apotheker erlangte.

Von Dezember 1972 bis September 1973 war ich tätig als Apotheker in der Continental Pharmacy in Windhoek/Südwest Afrika. Seit 15. Oktober 1973 bin ich am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen als wissenschaftliche Hilfskraft tätig. Die vorliegende Dissertation wurde von Oktober 1973 bis Februar 1978 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. med. M.Siess an dem genannten Institut angefertigt.

Meine Herrn akademischen Lehrer waren u.a. die folgenden Professoren und Dozenten:

R. Alberts, H.P.T. Ammon, N.C. Arnold, H. Auterhoff, E. Breedenkamp, J. Decker, T. Decker, A.C. Dreyer, M. Duvenhage, A.P. Goosens, G. Goosens, D. Loots, P. Malan, J. Offermeyer, D.A. Reinecke, P. Reinecke, P. Sanders, K-Fr. Sewing, M. Siess, H. Smit, P. van der Walt, J. van der Watt, D. Winne.

## 6. Literaturverzeichnis

BEELER, G.W., REUTER, H. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. J.Physiol. 207, 191-209 (1970)

BERNE, R.M. Cardic nucleotides in hyopxia: possible role in regulation of coronary blood flow. Am.J.Physiol 204, 317-322 (1963)

BODENHEIMER, W. Über die Beziehungen zwischen Sauerstoffverbrauch und Tätigkeit des Froschherzens. Arch. Exp. Path u. Pharmak 80, 77-92 (1917)

BERNT, E., BERGMEYER, H.U., MÖLLERING, H. Bestimmung von Creatin. H.U. Bergmeyer - Methoden der Enzymatischen Analyse - Band II, Seite 1724, 2. Auflage 1970

BRETSCHNEIDER, H.J., Determinanten des myocardialen Sauerstoffverbrauchs. Die Therapeutische Anwendung ß-sympatolytischer Stoffe E.D. H.J. Dengler, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 45-60 (1972)

BROADLEY, K.J. The Effect of Temperature upon the Positive Inotropic and Chronotropic Responses of Isolated Cardic Preparations to Isoprenaline and its Modification by Experimental Variables. Arch. Int. Pharmacodyn. 220, 189-204 (1976)

BURK, H.C. Veraschungsschnellmethode zur Flammenphotometrischen Bestimmungen von Gewebsnatrium und Kalium. Klin. Wschr. 39, 751-754 (1961)

CHANG, I. Asphyxial arrest of the isolated rabbit's auricle. Quarterly J. Exp. Physiol. 27, 113-121 (1937)

CHANG, I. Effect of asphyxia on the ATP content of the rabbit's heart Quarterly J. Exp. Physiol 28, 3-13 (1938)

CRIE, S., WILDENTHAL,K., ADOCK,R., TEMPLETON,G., WILLERSON, J.T. Inhibition of inotropic effect of hyperosmotic manitol by lactate in vitro. Am.J. Physiol. 321, 1209-1213 (1976)

DANFORTH,W.H., NAEGLE,S., BING,R.J. Effect of Ischemia and Reoxygenation on Glycolytic Reactions and ATP in Heart Muscle. Circ. Res. Vol VIII, 965-971, Sep. 1960.

DARBY,T.S., ALDINGER,E., GADSDEN, R.H., THROWER,W.B. Effects of Metabolic Acidosis on Ventricular Isometric Systolic Tension and the Response to Epinephrine and Levarterenol. Circ. Res. 8, 1242-1253 (1960)

DELABAR,U. Die unterschiedliche Wirkung von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure auf die Funktion und auf den Pyridinnucleotidstoffwechsel des Herzmuskels. Dissertation, Naturwiss. Faklutät Tübingen 1976.

DÖRING,H.J., KAMMERMEIER, H. Änderungen des Herzdurchmessers unter dem Einfluß von Sauerstoffmangel; Stoffwechsel-Inhibitoren und erregungshemmenden Substanzen. Kreislaufmessungen, 4. Freiburger Colloquium, S 45, München-Gräfelfing (1964)

EGGLETON,C.P., EGGLETON,P. A Method of Estimating Phosphagen and some other Phosphorous Compounds in Muscle Tissue.J.Physiol.68, 193 (1929)

FREEZA,W.A., BING, O.H.L., $PO_2$-modulated performance of cardic muscle. Am. J. Physiol. 231, 1620-1624, (1976)

FREUND,H. KÖNIG,W. Herzarbeit ohne Sauerstoff. Arch. Exp. Path. und Pharmak. 125, 193 (1927)

FOX,A.C., WINKLER,N.S., REED,G.E. High energy compounds in the myocardium during experimental congestive heart failure. Purine and pyrimidine nucleotides, creatine and creatine phosphate in normal and failing hearts. J. Clin. Invest. 44, 202, (1965)

GERLACH,E., DEUTICKE,B. Bildung und Bedeutung von Adenosin in dem durch Sauerstoffmangel geschädigten Herzmuskel unter dem Einfluß von 2,6 Bis(Diaethanol amino)4, 8 Dipiprodinopyramido (5,4) Pyrimidon (Persantin$^R$). Arzneim. Forsch. 13, 48-50, (1963)

GIEBISCH,G., WIEDMANS,S. Membrane currents in mamalian ventricular heart muscle fibres using a voltage-clamp-technique. J. Gen. Physiol. 57, 290-296 (1971).

GOTTDENKER,F., WACHSTEIN,M. Effect of asphyxia on the rat's auricle. Biochem.Z. 267, 192 (1933)

GUDBJARNASON,S., MATHES,P., RAVENS,K.G. Functional Compartimentation of ATP and Creatinephosphate in Heart Muscle. J. Mol. Cell. Card. 1, 325, (1970)

GÜNTHER,J., ODDOY,A., SCHUBERT,E. Die Wirkung von Anoxie auf die Energiebereitstellung und isotonische Arbeitsleistung des Froschventrikels. Acta Biol. Med. Germ. 35, 1533-1540, (1976)

HEARSE,D.J., CHAIN,E.B. The Role of Glucose in the Survival and "Recovery" of the Anoxic Isolated Perfused Rat Heart. Biochem. J. 128, 1125-1133, (1972)

HEARSE,D.J., HUMPHREY,S.M. GARLICK,P.B. Species Variation in Myocardial Anoxic Enzyme Release, Glucose Protection and Reoxygenation Damage. J. Molec. and Cell. Card. 8, 329, (1976)

HEARSE,D.J., OPIE,L.H., KATZEFF,I. Metabolic, Electrophysiological and flow gradients within the "Boarder Zone" during regional ischemia. J. Molec. Cell. Cardiol. 9, Supp 1977, R 32, 19.

HEILBERG,K. Tierexperimentelle Untersuchungen über das Energiedefizit und die Energiebereitstellung im ischämischen Myocard. Dissertation, med. Fakultät, Gottingen (1970).

HOHORST,H.J. L(+)-Laktat Bestimmung mit Laktatdehydrogenase und NAD. H.U.Bergmeyer-Methoden der Enzymatischen Analyse - Band II, Seite 1425, 2. Auflage 1970

HOPKINS,S.V. The potentiation of the action of adenosine on the guinea - pig heart. Biochem. Pharmac. 22, 341-348, (1973)

IMAI,S., RILEY,A.L., BERNE,R.M. Effect of Ischemia on Adenine Nucleotides in Cardic and Skeletal Muscle. Circ. Res. 15, 443-450, (1964)

ITZEL,W. Die Beteiligung des Glykogens am Energieumsatz isolierter, spontanschlagender Herzvorhöfe in Abhängigkeit von Exogenen Substanzen und nach Einwirkung von Adrenalin. Inaugural Dissertation, med. Fakultät, Tügingen (1969)

JACOB,M., BERNE,R.M. Metabolism of purine derivates by the isolated cat heart. Am. J. Physiol. 198, 322 - 326, (1960)

JAWOREK,D. GRUBER,W., BERGMEYER,H.U. Bestimmung von Adenosin 5'diphosphat und Adenosin 5'monophosphat. H.U.Bergmeyer - Methoden der Enzymatischen Analyse - Band II Seite 2051 2. Auflage 1970.

KATZ,A.M.Contractile proteins of the heart. Physiol. Rev. 50, 63-158, (1970)

KELLER,H.J. Die gleichzeitige und kontinuierliche Messung von Kontraktionsleistung, Frequenz, Decarboxylierungsrate $^{14}C$-markierter Substrate und Sauerstoffverbrauch isolierter, spontanschlagender Meerschweinchenherzvorhöfe als Methode zur Prüfung herzwirksamer Pharmaka. Inaugural Dissertation med. Fakultät Marburg (1970)

KREBS,H.A. HENSELEIT,K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 210, 33-66, (1932)

KRUTA,V. Sur L'activité rhythmique du nusclé cardiaque. 1. Variations de la response mechanique en fonction du rhythme. Arch. Int. Physiol. XLX, 342, (1937)

KRUTA,V. Sur L'activité thytmique du muscle cardiaque - variations en fonction de la temperature des relations entre la response mecanique et le rhytme. Arch. Int. Physiol. XLVII, 40, (1938)

KÜBLER,W. Stillstand, Überlebenszeit und Wiederbelebung des Herzens. Arzneim. Forsch, 20, 333-343, (1970)

LAMPRECHT,W., STEIN,P., HEINZ,F., WEISSER,H. Bestimmung von Creatinphosphat. H.U. Bergmeyer - Methoden der Enzymatischen Analyse Band II Seite 1729 2. Auflage 1970

LAMPRECHT,W., TRAUTSCHOLD,I. ATP-Bestimmung mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase. H.U.Bergmeyer-Methoden der Enzymatischen Analyse - Band II, Seite 2024, 2. Auflage 1970.

LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., RANDALL,R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265, (1951)

LÜLLMANN,H., PETERS,T. Plasmalemmal calcium in cardiac excitation-contraction coupling. Clin. exp. Pharmacol. Physiol. 4, 49-57, (1977)

MASIGLIA,J.C.,CINGOLANE,H.E., GONZALEZ,N.C. Relevance of Beta Receptor Blockade to the Negative Cnotropic Effect Induced by Metaboic Acidosis. Cardiovasc. Res. 7, 336-343, (1973)

MATHES,P. Die kontraktile Funktion des überlebenden Herzmuskels nach Koronarverschluß. Klin.Wschr. 55, 463-469, (1977)

McDONALL,T.F., MacLEOD,D. Metabolism and the electrical activity of anoxic ventricular muscle. J. Physiol. 229, 559-582, (1973 a)

McDONALD,T.F., MacLEOD,D. DNP-Induced dissipation of ATP in anoxic ventricular muscle. J. Physiol. 229, 583-599, (1973 b)

MacLEOD,D., PRASAD,K. Influence on the transmembrane action potential of papillary muscle. Effects of contraction, phlorizin and insulin, non-metabolizable sugars and stimulators of glycolysis. J. Gen. Physiol. 53, 792-815, (1969)

MARSCHER,D., PEPER,K. Two Components of Inward Current in Myocardial Fibres. Pflügers Arch. ges. Physiol. 307, 190-203, (1969)

MENSING,H.J. An improved method for continouos recordings of various contraction parameters, decarboxylation rate of $^{14}C$-marked substrate, and oxygen consumption of isolated heart atria preparations. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, R64 Supp 1974

MENSING,H.J. Die Badmethode für isolierte Muskelpräparate. Inaugural Dissertation, med Fakultät, Tübingen 1977

MICHAL,G., NAEGLE,S., DANFORTH,W.H. Metabolic changes in heart muscle during anoxia. Am. J. Physiol. 196, 1147-1151, (1959)

MÖLLER,H., DELABAR,U., SIESS,M. Investigation on the Preiss-Handler cycle in heart muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Supp 285, R55, (1974)

MUIR,R.J., DHALLA,N.S., ORTEZA,J.M., OLSON,R.E. Energy-linked transport in subcellular fraction of the failing rat heart. Circ.Res., 26, 429 (1970)

NAKAMARU,Y., SCHWARTZ,A. Possible control of intracellular calcium metabolism by $H^+$:Sarcoplasmic reticulum of skeletal mescle. Biochem. Biophys. Res. Communic. 41, 830, (1970)

NAMM,D.H. Comparison of the rates of formation of purine nucleotides from various precursors and identification of the enzymatic routes for nucleotide formation in the isolated rat heart. Circ.Res. Vol XXXIII, 686, (1973)

OLSON,R.E., BARNHORST,D.A. The control of energy production and utilisation in cardic muscle. Myocardial metabolism, Ed. by N.S. Dhalla, Winipeg, Vol 3, Urban + Schwarzenberg München - Berlin - Wien (1974)

OLSSON,R.A., SNOW,J.A., GENTRY,M.K., FRIK,G.P. Adenosine uptake by cannine heart. Circ. Res. 31, 767-778, (1972)

OPIE,L.H. Effect of extracellular pH on function and metabolism of isolated perfused rat heart. Am.J. Physiol. 209, 1075-1080, (1965)

OSTHEIM,B.D., Kinetik der Oxidation kurzkettiger Fettsäuren im Herzmuskel und ihre wechselseitige Konkurrenz mit dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Inaugural Dissertation, med Fakultät, Marburg 1972

PARRAT,R.J., MARSHALL,R.J. The response of isolated cardic muscle to acute anoxia: protective effect of adenosinetriphosphate and creatinephosphate. J. Pharm. Pharmac. 26, 427-433, (1974)

PENN,R.G. Some factors influencing the recovery of isolated myocardium from acute anoxia. Brit.J. Pharmacol. 24, 253-265, (1965)

RÖGER,U. Histologische, autoradiographische und biochemische Untersuchungen zur Frage der Energieversorgung und des Einbaus von $^{14}C$-markierten Substanzen in isolierten, spontanschlagenen Herzvorhöfen von Meerschweinchen. Inaugural Dissertation, med Fakultät, Marburg 1970

SCHADLER,J., BERNE,R.M., RUBIO,R. Uptake and metabolism of adnosine by human erythrocyte ghosts. Am. J. Physiol. 223, 159-166, (1972)

SCHADLER,M.H. Proportionale Aktivierung von ATPase-Aktivität und Kontraktionsspannung durch Calciumionen in isolierten kontraktilen Strukturen verschiedener Muskelarten. Pflügers Arch. 296, 70-90, (1967)

SCHEUER,J., STEZOSKI,W.S. Protective role of increased myocardial glycogen stores in cardic anoxia in the rat. Circ. Res. XXVII, 835-849, (1970)

SCHMID,W., SIESS,M. Über die Grenzbedingungen von Zelleben und spezifischer Zellfunktion am isolierten Muskel. Pflügers Arch. 263, 492-510, (1956)

SCHRAVEN,E. Regulation des Fett- und Kohlenhydrat-stoffwechsel des Herzens durch Carbochromen. Arzneim. Forsch. 26, 2, 197-200, (1976)

SCHWARTZ.A. Active transport in Mammalian Myocardium. In: The Mammalan Myocardium. Herausgegeben von G.A.LANGER und A.J.BRADY, New York:John Wiley & Sons, 1974, Seite 81-104.

SEIFART,H., von HEES,U., SIESS,M. Anaerobic contractile activity of isolated guinea pig atria. 17. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Mainz 1977 Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Supp (1977) 293, R28, 109

SEIFART,H., POPLAWSKI,S., SIESS,M. Anaerobic contractile activity and metabolic changes of isolated guinea pig atria. Binnanual Meeting of the International Study Group for Research in Cardic Metabolism (European Section)-Rotterdam 1977. Journ. of Molec. and Cell. Cardiol. Supp (1977), 9, R80 49-50.

SEIFART,H., POPLAWSKI,S., SIESS,M. Annaerobic contractile activity and metabolic changes of isolated guinea pig atria. Sixth Congress of the Polish Pharmacological Society - Katowice Poland. Abstracts, Seite 198-200

SHIMOYAMA,E., KAWAI,M., HOSHI,Y., UEDA,I. Nicotinamide inhibition of 3'5'-cyxlic AMP phosphodiesterase in vitro. Biochem. Biophys. Res. Comun. 49, 4, 1137-1141, (1972)

SIMON,H.J. Herzwirksame Pharmaka, Wirkweise und klinische Anwendung. Herzwirksame Pharmaka, 2. Auflage, Ed. H.J. Simon, Urban + Schwarzenberg München - Berlin-Wien (1974)

SIESS,M. Funktion und Energiestoffwechsel des erschöpften Herzmuskels unter der Wirkung von 2,6 bis (diaethylamino)-4,8 dipiperidino-pyrimido(5,4d) Pyrimidin (Persantin$^{R}$). Arzneim. Forsch. 12, 683-691, (1962)

SIESS,M. Influences on the effiency of cardiac work. Basic. Res. Cardiol. 72, 299-305, (1977)

SIESS,M., KELLER,H.J., SCHARE,E., GEISSLER,J. The Continious and Simultaneous Measurement of $O_2$-Consumption, Rate of Decarboxylation of $^{14}C$-Substrates and the Performance of Spontaneously-beating Heart Atria of Guinea Pigs. J. of Molec. and Cell. Card. 1, 261, (1970)

SPIECKERMANN,P.G. Stillstand, Überlebenszeit und Wiederbelebung des Herzens. Arzneim. Forsch., 20, 333-343, (1970)

SPIECKERMANN,P.G. Überlebens- und Wiederbelebungszeit des Herzens. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1973. Ed. P.G. Spiekermann.

SÜßKAND,K. Stoffwechsel und Funktion des Herzmuskels unter langkettigen Fettsäuren. Dissertation naturwiss. Fakultät, Tübingen (1976)

SUIGITA,Y., SIMON,R. The Metabolism of Action of Adenine in Red Cell Preservation. J. of Clin. Invest. 44, 629, (1965)

TRAUTWEIN,W., DUDEL,J. Aktionspotential und Kontraktion des Herzmuskels im Sauerstoffmangel. Pflügers Arch. 263, 23-32, (1956)

VON HEES,U. Elektrolyt- und Funktionsänderungen von isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen nach Einwirkung von Isoprenalin. Diplomarbeit Tübingen, 1976

WARBURG,O. Versuche an überlebendem Carcinogengewebe (Methoden). Biochem. Z. 142, 317-333, (1923)

WEBB,L.J., HOLLANDER,P.B. Metabolic aspects of the relationhips between the contractility and membrane potentials of the rat atrium. Circ. Res. 4, 618-626, (1956)

WEIZSÄCKER,V. Arbeit und Gaswechsel am Froschherzen. Pflügers Arch. ges. Physiol 147, 135-152, (1912)

WEIZSÄCKER,V. Über die Abhängigkeit der Strophanthinwirkung von der Intensität der Herztätigkeit. Arch. Exp. Path. und Pharmakol. 72, 283-294,(1913)

WIELAND,H. Entgiftung durch adobtive Verdrängung. Ein Beitrag zur Kenntnis der Ermüdung des überlebenden Froschherzens und der Herzwirkung des Kampfers. Arch.Exp.Path. und Pharmakol. 89, 46-65, (1921)

WILLIAMSON,J.R. Effects of Insulin and Diet on the Metabolism of L(+)-Lactate and Glucose by the Perfused Rat Heart. Biochem.J. 83, 377-383, (1962)

WINBURY,M.W. Influence of Glucose on Contractile Activity of Papillary Muscle During and After Anoxia. Am.J. Physiol. 187, 135-138, (1956)

WOLLENBERGER,A., RISTAU,O., SCHOFFA,G. Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung großer Gewebestücke. Pflügers Arch. Ges. Physiol. 270, 399-412, (1960)

WOLLENBERGER,A., SHAHAB,L. Anoxia - induced release of noradrenaline from the isolated heart. Nature 207, 8, (1965)

YANG,W.C. Anaeroic functional activity of isolated rabbit atria. Am. J. Physiol. 205, 781-784, (1963)